

Synthese und Eigenschaften unpolarer Rückgrat modifizierter DNA sowie deren Anwendung als Antisense-Oligonucleotide gegen Hepatitis C Virus RNA



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stefan Amberg
aus
Marktoberdorf

Frankfurt am Main
Juni 2003
(D F 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften (FB 14) der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W.E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. J.W. Engels und Prof. Dr. M. Göbel

Datum der Disputation: 21.10.2003

Meinen Eltern,

in
Dankbarkeit
und Liebe
gewidmet

Forschung ist,
zu sehen, was jeder schon gesehen hat,
und zu denken,
was noch niemand gedacht hat.

Johann Wolfgang von Goethe

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels in der Zeit von Oktober 1999 bis Juni 2003 angefertigt.

Herrn **Prof. Dr. Joachim W. Engels** danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen und die gewährte akademische Freiheit. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen sowie die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen hat er wesentlichen Einfluss auf diese Arbeit genommen.

Herrn Prof. Göbel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang H. Caselmann und Frau Anja Tamke an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität zu Bonn danke ich für die Durchführung und Einweisung in die *in vitro* und Zellkultur-Untersuchungen.

Priv. Doz. Dr. M. Scherr von der Medizinischen Hochschule Hannover für die Durchführung der RNase H Spaltungsexperimente.

Darüber hinaus danke ich allen Angehörigen des Instituts und des Fachbereichs Chemie, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Meinen Laborkollegen Astrid Klöpffer und Jörg Parsch für die kritische Durchsicht des Manuskripts und der äußerst angenehmen Arbeitsatmosphäre.
- Meinen Kollegen Jörg Parsch, Thorsten Strube, Kerstin Jahn-Hofmann und Astrid Klöpffer für Freundschaft, die gute Zusammenarbeit sowie deren stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- Hannelore Brill und Ilona Priess für die Messung der Massenspektren.
- Rainer Schmidt und Beate Conrady für deren stete Hilfsbereitschaft.
- Prof. Dr. Valentin Wittmann für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Bestellung von Literatur.

- Dr. Zimmermann für seine Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der 2D-NMR-ROESY Spektren. Ferner seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Frau Schmid, Frau Langner, Frau Kaiser und Herrn Olbrich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.
- Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen für die präparativen HPLC-Trennungen der Oligonucleotid-Dimere.
- Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt ferner:

- der Hermann Willkomm-Stiftung für die finanzielle Beihilfe zum Besuch des „XIVth International Roundtable Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications“ vom 10.09. – 14.09.2000 in San Francisco, USA und des „XIIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components“ vom 04.09. – 10.09.2002 in Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik.
- dem Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie für ein Kékulé-Promotionsstipendium.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden Dr. Oliver Denk, Dr. Alexander Bachmann, Sarah Pape-Bachmann, Sonja Kreischer und Dr. Georg Becher die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Regulation der Genexpression	9
2.1	Der Ribozym-Ansatz	10
2.2	RNA-Interferenz (RNAi)	12
2.3	Das Antisense-Konzept	14
2.3.1	Wirkungsmechanismen	14
2.3.2	Kriterien an Antisense-Oligonucleotide	17
2.3.3	Chemische Modifikationsmöglichkeiten	24
2.3.4	Therapeutische Anwendungen	26
3	Rückgratmodifikationen	29
3.1	Konfiguration der Rückgrat-Modifikation	30
3.2	Phosphorthioate	31
3.3	Methyl-, Phenyl-, Benzyl- und Octylphosphonate	32
3.4	Interkalation / „Dangling-End“-Effekt	35
4	Hepatitis C Virus	39
4.1	Prävalenz, Übertragung, Genotypen, Therapie	39
4.2	Struktur des Hepatitis C Virus	42
4.3	Antisense-Strategien gegen HCV	44
5	Aufgabenstellung	47
6	Chemische Synthesen	51
6.1	Auswahl der Modifikationen	51
6.2	Synthesestrategie	53
6.3	Synthese der modifizierten Phosphoramidite	54
6.3.1	Synthese der Arylalkylhalogenide	54
6.3.2	Synthese der (Arylalkyl)dichlorphosphane	60
6.3.3	(Arylalkyl)(diisopropylamin)chlorphosphane	66

6.3.4	Synthese arylalkylmodifizierter Phosphoramidite.....	68
6.3.5	^{31}P -NMR-Spektren der P(III)-Verbindungen.....	72
6.4	Arylalkylmodifizierte Nucleotid-Dimere.....	75
6.4.1	Synthese der Dimere.....	75
6.4.2	Entschützung / Synthese der Phosphoramidit-Dimere.....	77
6.4.3	^{31}P - ^1H -NMR-Spektren der P(V)-Verbindungen.....	80
7	Oligonucleotid-Synthese.....	83
7.1	Synthetisierte Oligonucleotide.....	83
7.2	Aufreinigung / Diastereoisomerentrennung.....	88
7.3	Charakterisierung der Oligonucleotide.....	93
8	Eigenschaften der Oligonucleotide.....	97
8.1	Bestimmung der Duplex-Schmelztemperaturen.....	97
8.1.1	T_m -Werte modifizierter Hexamere.....	100
8.1.2	T_m -Werte modifizierter Dodecamere.....	107
8.1.3	Stabilisierung von DNA-Ausbuchtungen?.....	111
8.2	Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen.....	113
8.3	CD-spektroskopische Untersuchungen.....	116
8.4	Lipophilie der Oligonucleotide.....	122
9	Bestimmung der absoluten Konfiguration der Modifikation.....	127
9.1	Methylphosphonat-Dimere.....	127
9.2	Zuordnung der absoluten Konfiguration bei 3-Phenylpropyl- phosphonat-Dimeren.....	129
9.2.1	Empirische Regeln.....	131
9.2.2	2D-ROESY-NMR-Messungen.....	132
10	Antisense-Oligonucleotide gegen HCV.....	141
10.1	Zielsequenz / Bisherige Resultate.....	141
10.2	T_m -Werte der Antisense-Oligonucleotide.....	145
10.3	CD-spektroskopische Untersuchungen.....	147
10.4	Lipophilie der Antisense-Oligonucleotide.....	150
10.5	Stabilität gegenüber Nuclease P1.....	151

10.6	Aktivierung der RNase H.....	153
10.7	<i>In vitro</i> -Untersuchungen.....	155
10.7.1	Zellfreie <i>in vitro</i> -Untersuchungen.....	155
10.7.2	<i>In vitro</i> Zellkultur-Untersuchungen.....	158
11	Zusammenfassung.....	163
12	Experimenteller Teil.....	169
12.1	Allgemeines.....	169
12.2	Synthese der Einzelverbindungen.....	172
12.3	Oligonucleotide.....	304
12.3.1	Eingesetzte Pufferlösungen.....	304
12.3.2	Synthese der Oligonucleotide.....	305
12.3.3	Entschützung / Aufreinigung / Diastereoisomerentrennung.....	306
12.3.4	Analytik.....	314
12.3.5	Aufnahme von UV-Schmelzkurven.....	316
12.3.6	Bestimmung der Stabilität gegenüber Nucleasen.....	317
12.3.7	RP-HPLC-Retentionszeiten.....	317
12.3.8	CD-Spektroskopie.....	317
12.3.9	Fluoreszenz-Spektroskopie.....	318
13	Literatur.....	319
14	Anhang.....	349
Teil A	Ausgewählte Spektren.....	349
Teil B	Abkürzungsverzeichnis.....	370
Teil C	Publikationen, Vorträge und Poster.....	377

1

Einleitung

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnte das Makromolekül DNA aus Zellen isoliert werden. Aber erst Oswald T. Avery und seine Mitarbeiter konnten 1944 nachweisen, dass DNA der Träger von genetischer Information ist (Avery *et al.*, 1944). Mit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 wurde ein Meilenstein für die Genetik gelegt (Watson & Crick, 1953a). Sie konnten mittels Raummodellen zeigen, dass die durch Chargaff aufgestellte Regel, dass sich die Mengen an Adenin (A) und Thymin (T) sowie an Guanin (G) und Cytosin (C) in einem DNA-Molekül entsprechen (Chargaff, 1951) und die von Todd gefundenen Ergebnisse, dass die Nucleotide über 5'-3'-Phosphordiesterbrücken verknüpft sind (Brown & Todd, 1952) in Einklang zu bringen sind. Die gefundenen Daten ließen sich nur durch eine Helixstruktur, welche aus zwei antiparallelen Einzelsträngen aufgebaut ist, erklären, deren 2'-Desoxyribose-Phosphat-Rückgrate nach außen und die Nucleobasen nach innen zeigen. Dabei sind Adenin und Thymin über zwei Wasserstoffbrücken sowie Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrücken verbunden. Im Falle der RNA kommt es zu einem identischen Basenpaarungsmuster (Bp). Der Unterschied zwischen DNA und RNA liegt darin, dass im Falle von RNA Thymin durch Uracil ersetzt ist und die Zuckereinheit aus Ribose besteht (Abb. 1.1).

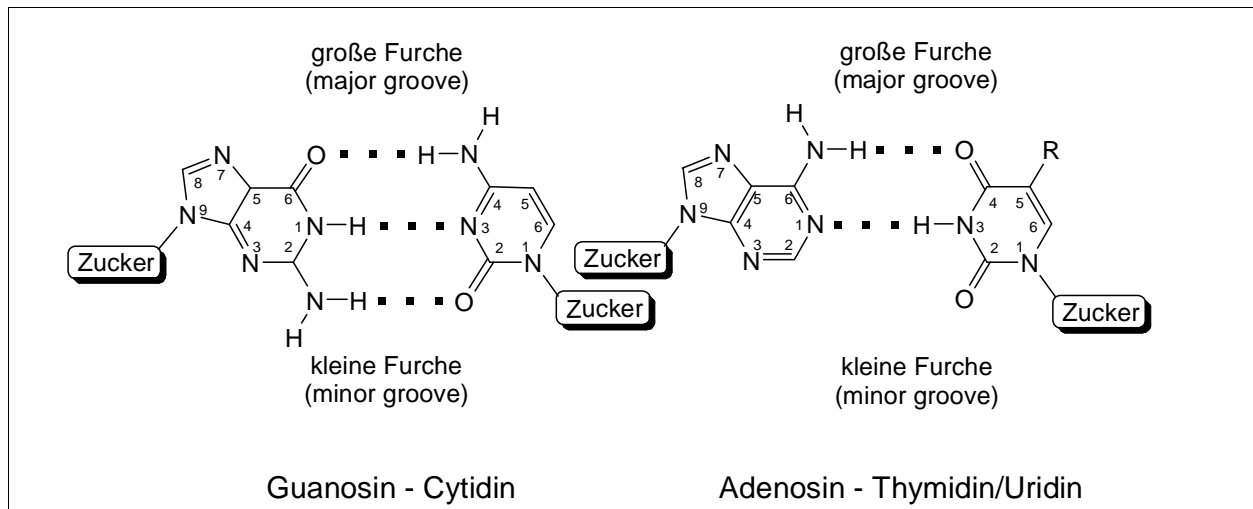


Abb. 1.1 Watson-Crick Basenpaare, **DNA**: $R=CH_3$, Zucker= 2'-Desoxyribose; **RNA**: $R=H$, Zucker= Ribose

Die Nucleotidstränge in einer DNA (B-Form) bauen dabei eine rechtsgängige Doppelhelix auf, wobei die Stränge antiparallel verlaufen (Abb. 1.2). Die Ringebene der Nucleobasen steht annähernd senkrecht auf der Helixachse, während die Zucker wiederum fast senkrecht zu den Nucleobasen angeordnet sind. Der Doppelstrang wird durch die Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen der gegenüberliegenden Stränge, durch π - π -Basenstapelungswechselwirkungen (engl.: *base stacking*) zwischen den Nucleobasen des gleichen Stranges und durch die Hydratation der Helix stabilisiert. Neben der B-Form, die von Watson und Crick vorgeschlagen wurde, sind heute noch andere Helixstrukturen wie die linksgängige Z-Form und die rechtsgängige A-Form bekannt (Saenger, 1984). Letzterer Strukturtyp tritt meistens bei RNA-Duplexen wie auch bei RNA-DNA-Chimären auf. Die Z-Form bildet sich bei DNA bevorzugt in Lösungen mit hoher Salzkonzentration aus (Wang, 1979; Gessner, 1989). Die wesentlichen Unterschiede der Helixtypen sind in Tab. 1.1 aufgeführt.

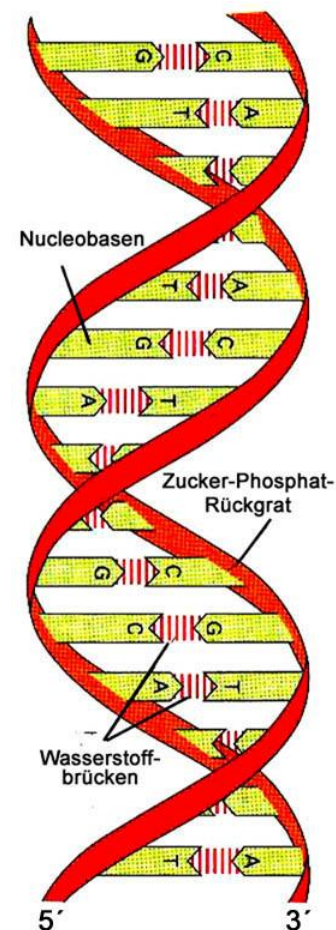


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix (B-Form)

Tab. 1.1 Vergleich von A-, B- und Z-Helixform

	A- Form	B- Form	Z- Form
Gestalt	am breitesten	zwischen A und Z	am längsten
Richtung	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Höhe pro Bp	0,23 nm	0,34 nm	0,38 nm
Helixdurchmesser	2,55 nm	2,37 nm	1,84 nm
Konformation der glykosidischen Bindung	anti	anti	anti bei C und T syn bei G und A
Zahl der Bp pro Helixwindung	11	10,4	12
Ganghöhe	2,46 nm	3,32 nm	4,56 nm
Neigung der Bp zur Helixachse	19°	1°	9°
große Furche	eng und tief	breit und tief	Flach
kleine Furche	breit und flach	eng und tief	eng und tief

Ein wichtiges Kriterium für die Form der Helix ist die Konformation der Ribose/2'-Desoxyribose (engl.: *suger puckering*), da der Furanosering nicht planar vorliegt. Er kann in der E-Konformation (engl.: *envelope*) oder in der T-Konformation (engl.: *twist*) vorliegen (Abb. 1.3). Bei der E-Konformation liegen vier Atome des Rings in einer Ebene und das Fünfte steht ca. 0,5 Å nach oben oder unten aus der Ebene heraus. Bei der T-Konformation liegen drei Zentren in einer Ebene und zwei benachbarte Zentren stehen, eines nach oben und eines nach unten, aus der Ebene heraus. Atome, die aus diesen Ebenen auf der selben Seite stehen wie C5' werden mit *endo* bezeichnet. Stehen diese auf der anderen Seite wird die Bezeichnung *exo* verwendet.

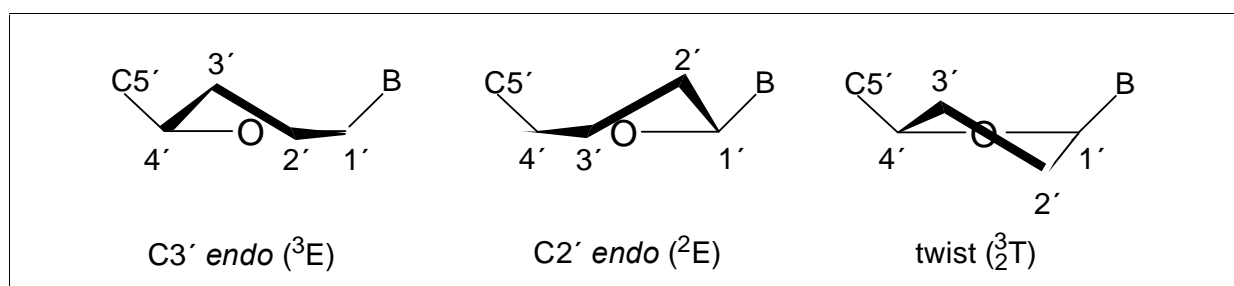


Abb. 1.3 Konformationen des Furanoserings

Die C2'-*endo*-Konformation des Furanoserings führt zur Ausbildung einer Helix der B-Form, während die C3'-*endo*-Konformation die Formierung einer Helix der A-Form induziert.

Über das 1'-Kohlenstoffatom sind die heterocyclischen Basen stets β -N-glycosidisch mit der Pentose verbunden. Relativ zum Zucker kann die Base zwei Hauptorientierungen über die glycosidische C1'-N-Bindung einnehmen. Diese beiden Orientierungen werden *syn* und *anti* genannt. Sie werden über den Torsionswinkel χ definiert (IUPAC, 1983). In der *anti*-Konformation zeigt der Hauptteil des Heterocyclus vom Zucker weg. Bei natürlichen Nucleosiden liegt normalerweise stets die *anti*-Konformation vor. Das Rückgrat eines DNA-Moleküls ist nicht symmetrisch und weist an seinen Enden eine sekundäre 3'- und eine primäre 5'-Hydroxylgruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften auf. DNA-Moleküle besitzen aufgrund ihres Phosphodiester-Rückgrats einen stark polyanionischen Charakter. Aufgrund dessen sind sie gut wasserlöslich und können durch Zugabe von Alkohol gefällt werden.

Watson und Crick waren es auch, die kurz nach ihrer Veröffentlichung der Struktur der DNA ein Modell für die Replikation der DNA vorschlugen (Watson & Crick, 1953b). In den darauffolgenden Jahren wurde der Fluss der genetischen Information vom Gen zum Protein untersucht. Aufbauend auf diesen Forschungen wurde von Francis Crick das sogenannte „Zentrale Dogma der Molekularbiologie“ über den Informationsfluss in der Zelle aufgestellt, dass bis zum heutigen Tage, bis auf wenige Ausnahmen, Gültigkeit besitzt (Crick, 1958; Crick, 1970) (Abb. 1.4). Demnach ist die DNA für die Speicherung und Weitergabe der genetischen Information verantwortlich. Diese wird bei der Transkription im Zellkern in die messenger-RNA (mRNA) übersetzt (Jacob, 1961).



Abb. 1.4: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Bei der anschließenden Translation an den Ribosomen wird die mRNA im Cytoplasma mittels der transfer-RNA (tRNA) in eine Proteinsequenz umgeschrieben. Eine Ausnahme für dieses Dogma stellt die Übersetzung von genetischer Information von RNA in DNA bei der reversen Transkription dar. Diese ist Teil des Lebenszyklus von Retroviren wie z.B. von HIV.

Die Frage der spezifischen Übersetzung der mRNA in die 20 natürlichen Aminosäuren eines Proteins konnte Anfang der sechziger Jahre geklärt werden. Die mRNA wird dabei durch Basentriplets (Codons) in die entsprechende Aminosäure übersetzt (Ochoa, 1963; Nirenberg, 1963; Khorana, 1965). Dadurch wurde klar, dass viele Aminosäuren durch mehrere Codons codiert werden, sowie dass drei Codons keiner Aminosäure entsprechen. Diese codieren den Abbruch einer Sequenz. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass das Basentriplett AUG nicht nur für Methionin codiert, sondern auch das Startsignal der Proteinbiosynthese beinhaltet.

Mit der Entdeckung der Restriktionsenzyme war es Anfang der 70iger Jahre möglich DNA spezifisch zu schneiden und mittels Ligasen wieder neu zu verknüpfen (Kelly & Smith, 1970; Smith & Wilcox, 1970). Mit der Entwicklung der chemischen Sequenziermethode durch Maxam und Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977) sowie der enzymatischen Sequenzierung durch Frederick Sanger (Sanger, 1977) war es möglich die Nucleosidabfolge jeder DNA-Sequenz zu bestimmen. Heutzutage hat sich die Methode nach Sanger durchgesetzt, da sie leicht automatisierbar ist. Die chemische Sequenzierung wird nur noch in wenigen Sonderfällen eingesetzt.

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) ist es seit 1984 möglich DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren (Saiki, 1985; Mullis, 1990; Newton, 1997). Bei diesem Verfahren wird ein Stück doppelhelikaler DNA denaturiert. Beim raschen Abkühlen hybridisieren die im Überschuss zugesetzten 20-30 Nucleotide langen Primer, die chemisch synthetisiert werden, unter kinetischer Kontrolle mit den komplementären DNA-Sequenzen. Durch Inkubation mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (z.B. TaqPol) in Gegenwart der vier Desoxyribonucleotidtriphosphate und Mg^{2+} -Ionen wird die DNA enzymatisch synthetisiert. Dieser Zyklus wird 20 bis 30 mal durchlaufen, wodurch die größtmögliche Amplifikation erzielt wird.

Parallel zu den enzymatischen Techniken wurden auch Methoden zur chemischen Synthese von DNA bzw. RNA entwickelt. Die routinemäßige, rasche Synthese von Oligonucleotiden konnte aber erst mittels der Festphasensynthese erreicht werden. In diesem Zusammenhang seien hier die Diester-, Triester- und die H-Phosphonatmethode genannt (Beaucage, 1993; Caruthers, 1992; Letsinger, 1976; Letsinger, 1975).

Heutzutage kommt jedoch fast ausschließlich die Phosphoramiditmethode, die von Beaucage und Caruthers entwickelt wurde, zum Einsatz (Beaucage, 1993; Caruthers, 1987; Beaucage, 1981). Der Syntheseyklus der Phosphoramiditmethode ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Die Synthese wird auf Glas mit definierter Porenweite (engl.: *controlled-pore-glass*, CPG; meistens 500 oder 1000 Å Porengröße) als fester Phase durchgeführt. Das erste Nucleosid ist über seine 3'-Hydroxylgruppe mittels eines basenlabilen Linkers (z.B. Succinyllinker) mit der festen Phase verknüpft. Der Zyklus wird durch die Entschützung der 5'-Hydroxylgruppe mit 3%iger Trichloressigsäure gestartet.

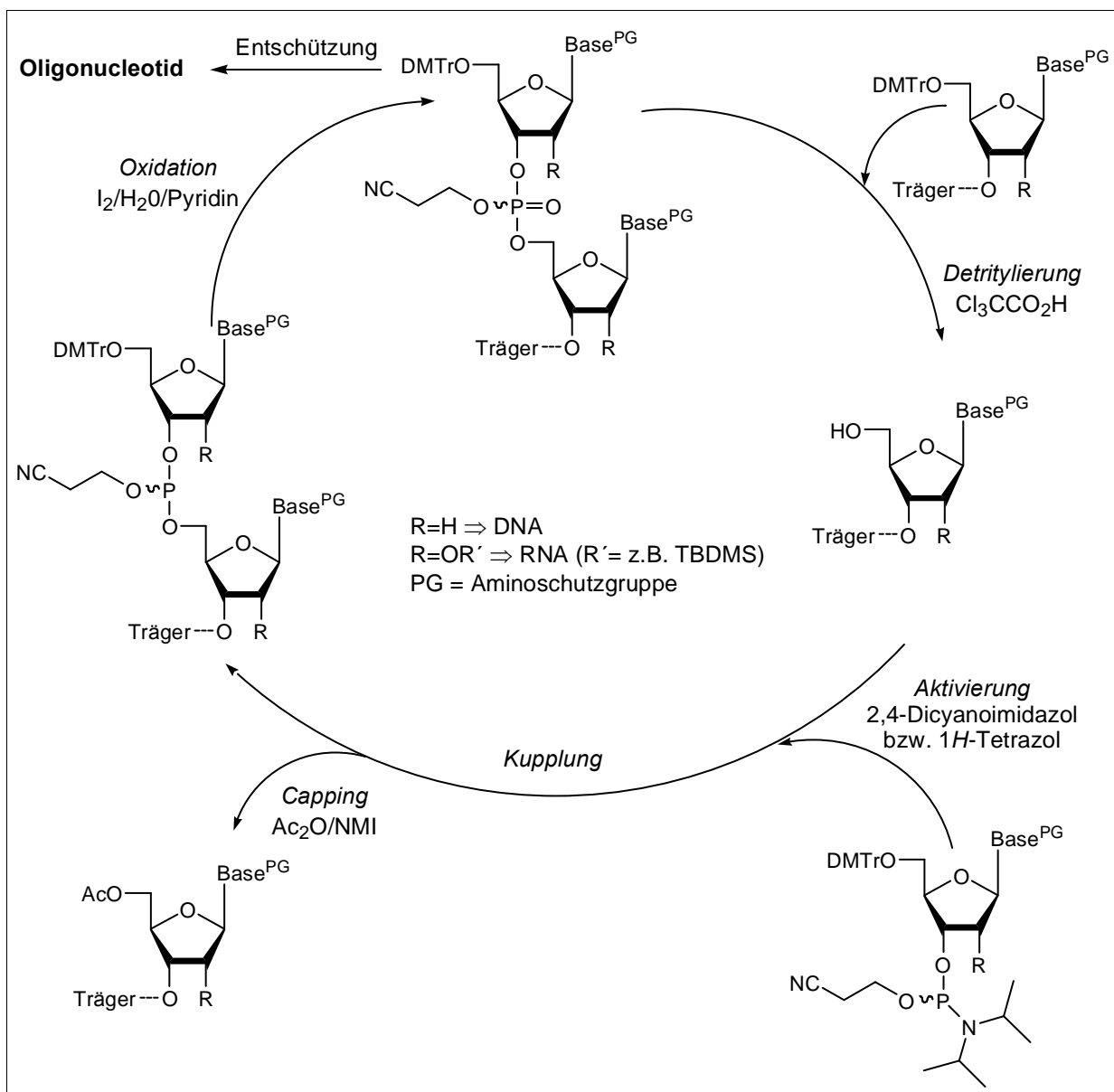


Abb. 1.5 DNA/RNA-Festphasensynthese (Phosphoramiditmethode)

Diese wird mit dem *N,N*-Diisopropylamino-phosphoramidit des geschützten Nucleosids (50-100 facher Überschuss) unter Aktivierung durch 1*H*-Tetrazol (Dahl, 1987) oder 2,4-Dicyanoimidazol zur Reaktion gebracht. Im nächsten Schritt werden die nicht abreagierten 5'-Hydroxylfunktionen durch Zugaben von Acetanhydrid maskiert (capping), so dass diese für die weiteren Reaktionen nicht mehr zur Verfügung stehen. Im Anschluss wird der dreiwertige Phosphor durch ein Gemisch aus $\text{Iod}/\text{H}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ zum fünfwertigen Phosphat oxidiert. Dieser Zyklus wird bis zur gewünschten Länge des Oligonucleotides durchlaufen. Aufgrund der sehr hohen Kupplungsausbeuten (>99,5%) lassen sich DNA-Stränge mit einer Länge von bis zu 200 Nucleotiden und RNA-Stränge bis zu einer Länge von 80 Nucleotiden in guter Ausbeute darstellen.

Die rasche Verfügbarkeit synthetischer Oligonucleotide beschleunigte in den letzten 15 Jahren die Erforschung ihrer Struktur, lieferte Primer für die enzymatische Synthese längerer Oligonucleotide mittels PCR, ermöglichte den kombinatorischen Aufbau von Oligonucleotidbibliotheken für die Chiptechnik und hat die Anwendung von Oligonucleotiden als Therapeutika ermöglicht. Das heutige Wissen über Struktur und Funktion von Oligonucleotiden führt zu einer stetig wachsenden Bedeutung dieser Verbindungsklasse bei dem gezielten Einsatz in der Therapie von Krankheiten. Maßgebendes Kriterium für die Anwendung ist die Kenntnis der Zielsequenz (DNA, mRNA, Protein). Mittels der enzymatischen Sequenzierung nach Sanger ist es möglich dieses Problem zu lösen. So wurde im Jahr 2000 das ca. 3,3 Milliarden Basenpaare umfassende menschliche Genom entschlüsselt (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Marshall, 2000). Auch die Genome anderer Tier- und Pflanzenarten wie der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* (Adams, 2000) und der Maus (Bradley, 2002) sind mittlerweile bekannt. Dem Wissen über die Sequenz eines Genoms folgt nun die Frage nach der Funktion seiner Gene und ihre Bedeutung im Organismus. Aufbauend auf die Erkenntnisse ergibt sich die Möglichkeit in den Informationsfluss der Proteinbiosynthese regulierend einzugreifen. Hier seien die Schlagwörter der modernen Biotechnologie „Genomics“ (das Gen betreffend) und „Proteomics“ (das Protein betreffend) zur Erforschung der Regulation der Genexpression genannt (Abb. 1.4).

2 Regulation der Genexpression

Die meisten der heute gegen die verschiedensten Krankheiten eingesetzten Arzneimittel entfalten ihre Wirkung durch die Wechselwirkung mit Proteinen, insbesondere mit Enzymen und Rezeptoren, die mit der jeweiligen Krankheit in Zusammenhang stehen. Ursächlich für viele Krankheiten sind aber meist fehlerhafte genetische Informationen und deren Ausführung durch die Zellen, wie beispielsweise die Überproduktion bestimmter Proteine oder die Herstellung defekter Proteine (Engels, 1991). Daher erscheint es sinnvoll mit der Therapie auf der übergeordneten Stufe der Nucleinsäuren einzusetzen. Die Blockade der Übersetzung der fehlerhaften genetischen Information in die daraus resultierenden Proteine erweist sich auch deshalb von Vorteil, da in einer Zelle aus jedem Gen bei dessen Transkription ungefähr 10^2 bis 10^4 Kopien mRNA entstehen, die wiederum in 10^4 bis 10^6 Proteinmoleküle translatiert werden. Ein wichtiges Beispiel stellt ferner eine Virusinfektion dar. Um sich zu vermehren, nutzt das Virus die Expressionsmaschinerie der Zelle. Eine gezielte Unterdrückung der Synthese viraler Proteine könnte die Vermehrung des Virus stoppen, ohne die Zelle selbst zu schädigen. Der Eingriff auf der DNA-Ebene mittels dem Antigen-Ansatz (z.B. Gen-Knockout, Triplex-Bildung) erwies sich als äußerst problematisch. Das Hauptproblem beim Triplex-Ansatz liegt in der relativen Instabilität der Triplexe und der Unzugänglichkeit der DNA im

Zellkern. Aus diesem Grund hat dieser Regulationsansatz in den letzten Jahren an Bedeutung verloren (Gewirtz, 1998; Vasquez, 1998; Sun, 1996). Für die Blockade der mRNA sind drei vielversprechende Ansätze zu diskutieren (Abb. 2.1). Diese sind:

- das **Antisense-Konzept**
- die **RNA-Interferenz (RNAi)**
- der **Ribozym-Ansatz**

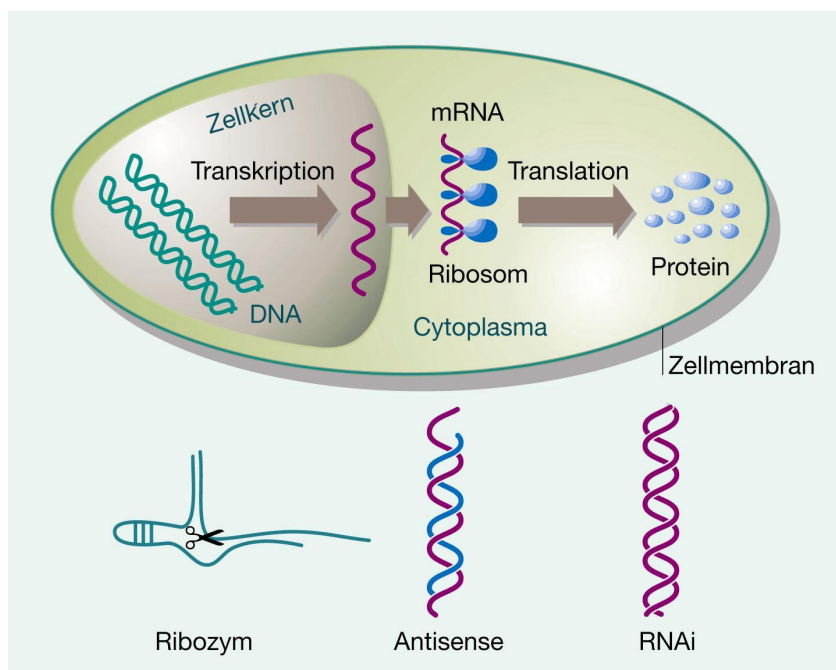


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Möglichkeiten des Eingriffs in die Genexpression auf der Ebene der mRNA im Cytoplasma

2.1 Der Ribozym-Ansatz

Ribozyme sind katalytisch aktive RNA-Moleküle. Dabei handelt es sich um relativ kurze Ribonucleinsäuren (<150 Nucleotide), die die Fähigkeit besitzen das RNA Phosphodiester-Rückgrat eines komplementären Oligonucleotids hydrolytisch und spezifisch zu spalten. Um dies zu ermöglichen ist lediglich die Gegenwart von Metallionen (Mg^{2+} , K^{+}) vonnöten. Ribozyme fungieren praktisch als Enzyme. Die

Spaltungsgeschwindigkeit ist jedoch deutlich langsamer als bei den Enzymen. Die Spaltung erfolgt durch eine beschleunigte Reaktion des Sauerstoffs der 2'-OH Gruppe mit dem Phosphor des 3'-Phosphates wobei, sich ein zyklisches 2',3'-Phosphat ausbildet. Die Spaltungsreaktion verläuft vermutlich über einen S_N2 -Mechanismus, da dabei die Chiralität des Phosphors invertiert (Van Tol, 1990; Koizumi, 1991). Von Interesse bezüglich einer therapeutischen Anwendung sind das Hammerhead- (Forster, 1987; Hazeloff, 1988) sowie das Hairpin-Ribozym (Feldstein, 1989). Das aus 55 Nucleotiden bestehende Hammerhead-Ribozym bildet einen Ribozym-Substrat-Komplex, wobei sich drei Helices ausbilden (Abb. 2.2).

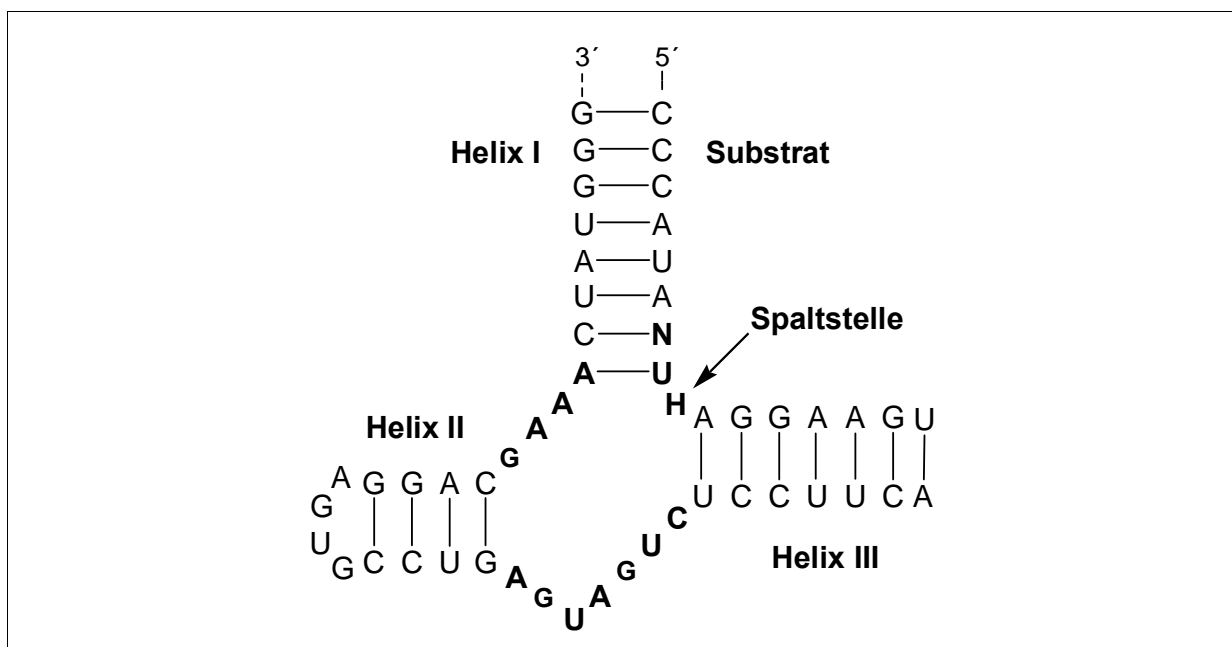


Abb. 2.2 Zweidimensionale Struktur des Hammerhead-Ribozyms

Für die therapeutische Anwendung fungiert die mRNA als Substrat und wird nach der Hybridisierung geschnitten. Die spezifische Spaltung erfolgt bei einem Hammerhead-Ribozym am 3'-Ende eines NUH-Tripletts. Dabei handelt es sich bei N um ein beliebiges Nucleotid und bei H um ein beliebiges Nucleotid mit Ausnahme von Guanotin (Hammann, 2002; Eckstein, 1999). In den letzten Jahren wurden sehr große Fortschritte auf den Gebieten der Strukturaufklärung, den katalytischen Mechanismen, der Aktivität und dem Einsatz als Therapeutikum erzielt (Krupp & Gaur, 2000; Goodchild, 2002). Einige funktionalisierte Ribozyme durchlaufen mittlerweile bereits die klinischen Studien der Phasen I und II (vgl. S. 27; Tab. 2.1). Dazu gehören „Angiozyme“ und „Heptazyme“, die gegen Krebs beziehungsweise den Hepatitis C Virus gerichtet sind.

2.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Erst vor einigen Jahren erkannte man, dass RNA eine fundamentale Rolle in der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression spielt. So löste die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) die Unterbrechung der Expression jener Gene aus, die sequenzhomolog zur angebotenen dsRNA waren (Fire, 1998). Dieses Phänomen wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Dieser Befund lieferte die Grundlagen für eine augenscheinlich einfache Methode, die Bildung ausgewählter Proteine durch die Einführung von exogenen dsRNAs zu unterbinden. Der Mechanismus der RNAi ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Abbildung 2.3 ist das gegenwärtige mechanistische Modell auf molekularer Ebene in *C. elegans* und anderen Spezies dargestellt (Micura, 2002; Schepers, 2001; Tuschl, 2001a). Die Transfektion mit doppelsträngiger RNA führt selbst bei katalytischen Mengen zum Abbau der sequenzhomologen mRNA. Die erste Stufe ist dabei die Spaltung der dsRNA in kleine Fragmente, die aus Strängen von 21 bis 23 Nucleotiden bestehen. Von Tuschl konnte gezeigt werden, dass diese kurzen RNAs (siRNA: engl.: *small interfering RNA*) die Schlüsselmoleküle für den Abbau der mRNA sind. Diese siRNA-Duplexe bilden jene bisher noch nicht vollständig charakterisierten RNA-Protein-Komplexe (siRNP bzw. engl.: RISC: *RNA induced silencing complex*), die für die eigentliche Spaltung der „Ziel“-RNA (Sense- oder Antisense-Strang) verantwortlich sind (Abb. 2.3). Abhängig von der Orientierung des Duplexes im RNA-Protein-Komplex und der Sequenz der mRNA ist nur einer der beiden siRNA-Stränge zur Erkennung der RNA-Zielsequenz fähig. Da dsRNA (500-1500 bp) in Säugerzellen eine Immunantwort auslöst, die für die Zellen toxisch ist, hat man die Wirkung chemisch synthetisierter siRNAs auf die Zelle untersucht und festgestellt, dass diese auch zum gewünschten Abbau der mRNA führen (Tuschl, 2001b). Mit synthetischen Oligoribonucleotiden konnte auch gezeigt werden, dass siRNA-Duplexe, die aus 21 oder 22 Nucleotiden bestehen und dabei nichtpaarende 3'-Dinucleotidüberhänge (Thymidine) aufweisen, effektiver im RNA-Abbau sind als die vergleichbaren Duplexe ohne 3'-Überhänge (Tuschl, 2003a; Tuschl, 2001b; Bernstein, 2001). Anwendungsmöglichkeiten für den RNAi-Ansatz bieten sich in der vollständigen Ausschaltung eines Proteins ohne Veränderung des genetischen Materials. Dies bietet die Möglichkeit, die Funktion von Proteinen zu untersuchen, was bereits bei Zebrafischen (Wargelius, 1999), *Drosophila* (Misquitta, 1999) und *C. elegans*

(Kamath, 2003; Tuschl, 2003b) erfolgreich gelungen ist. Die zweite Anwendungsmöglichkeit liegt darin, die Synthese von fehlerhaften Proteinen auf Ebene der mRNA mittels synthetischer 21- bis 22mere zu unterbinden. Auch wird versucht mit Hilfe dieser Technik die Genexpression von Viren zu unterbinden. Kommt es bei der Antisense-Technik, bei der eine 1:1-Hybridisierung von mRNA mit dem Antisense-Strang erfolgen muss, nur in wenigen Fällen zum vollständigen Ausschalten des Proteins, so führt der Einsatz katalytischer Mengen siRNA zum kompletten Abbau der zelleigenen mRNA dieser Sequenz (Brantl, 2002). Es gibt bei dieser Technik aber noch viele Unklarheiten, sowohl was den Mechanismus als auch was die Anwendungsmöglichkeiten betrifft. Auch ist eine direkte Übertragung der bei *C. elegans* gefundenen Ergebnisse auf Säugerzellen nicht möglich. Ein wichtiger Unterschied liegt in der dsRNA-Prozessierung, die in Säugerzellen nicht, bzw. mit Einschränkungen stattfindet. Zudem treten zur Antisense-Technik homologe Probleme, wie z.B. die geringe Zellaufnahme, auf.

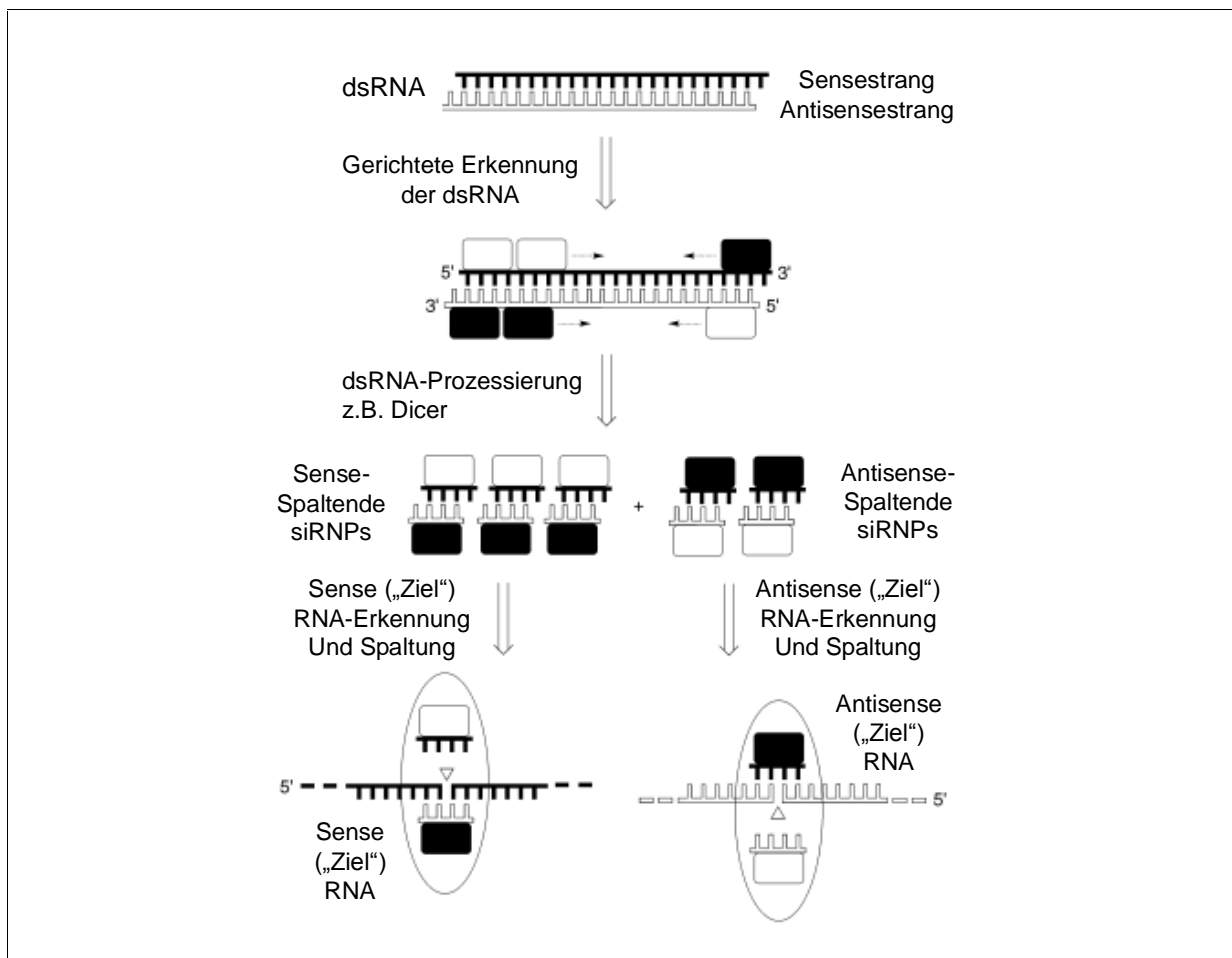


Abb. 2.3 Modell zum Mechanismus der RNA-Interferenz in *C. elegans*

2.3 Das Antisense-Konzept

Das Antisense-Konzept ist heutzutage der am Besten untersuchte Ansatz zur Regulation der Genexpression. Die gezielte Anwendung des Antisense-Konzepts wurde erstmalig von Zamecnik und Stephenson im Jahre 1978 verwirklicht (Zamecnik, 1978; Stephenson, 1978). Es gelang ihnen die Replikation von Rous-Sarkom-Viren in infizierten Hühnerfibroblasten durch Zugabe von synthetisch dargestellten Oligonucleotiden (13mere) zu inhibieren. Interessanterweise erkannte man aber erst einige Jahre später, dass Antisense-RNA als natürliches Regulationsprinzip der Proteinbiosynthese oder der DNA-Replikation in zahlreichen Viren und Bakterien fungiert (Uhlmann, 1990; Weintraub, 1990; Hjalte, 1992; Brantl, 2002).

Das Antisense-Konzept beruht auf der Hybridisierung von modifizierten, kurzen, einzelsträngigen Nucleinsäuren an komplementäre Bereiche einer mRNA oder viralen RNA. Dies führt zu einer Inhibierung der Translation in die entsprechenden Proteine. Die Selektivität der Erkennung beruht dabei auf der spezifischen Basenpaarung nach Watson und Crick. Dieses Bild des Wirkungsmechanismus stellt aber eine sehr vereinfachte Betrachtungsweise dar. In der Praxis spielen für die Wirkungsweise eines Oligonucleotides zahlreiche Faktoren eine entscheidende Rolle, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll. Auch soll erläutert werden, dass hinter der „simplen Theorie“ eine äußerst „komplexe Realität“ steckt.

2.3.1 Wirkungsmechanismen

Die Wirkungsweise von Antisense-Oligonucleotiden hängt u. a. sehr stark von der Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA-Zielsequenz ab. Dies hat zur Folge, dass diverse Mechanismen/Angriffspunkte postuliert, erforscht und bewiesen wurden. In Abbildung 2.4 ist der Weg der RNA ausgehend von der Transkription bis hin zur Translation schematisch dargestellt. Daraus ergeben sich diverse Angriffspunkte für den Einsatz von Antisense-Oligonucleotiden (Crooke, 1999). Im folgenden soll auf die wichtigsten Ansätze näher eingegangen werden.

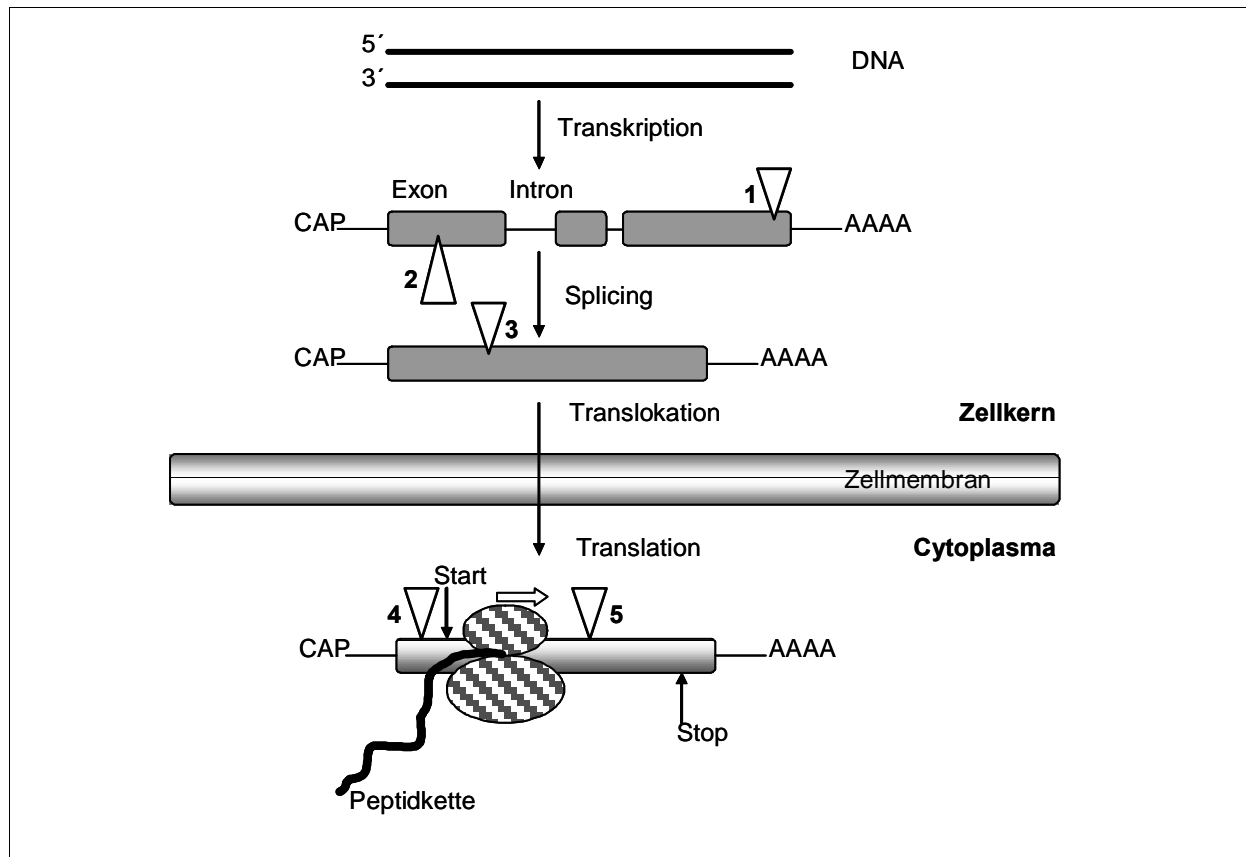


Abb. 2.4 Zusammenfassung der möglichen sequenzspezifischen Wirkungsmechanismen von Antisense-Oligonucleotiden; Inhibierung durch Unterbindung **1)** der 3'-Polyadenylierung (Chiang, 1991) bzw. des 5'-Capping (Baker, 1992), **2)** des Spleißens, **3)** der Translokation, **4)** der Anlagerung des Ribosoms bzw. der Initiationsfaktoren und **5)** der Fortbewegung des Ribosoms entlang der mRNA bzw. der Spaltung der mRNA durch die Aktivierung der RNase H.

Inhibierung des Spleißens

Ein wichtiger Zwischenschritt bei der Bildung der meisten mRNAs ist das Ausschneiden der Introns. Dieser Schritt findet wie auch die 3'-Polyadenylierung und das 5'-Capping im Zellkern statt. Der Spleißen-Vorgang ist sequenzspezifisch und erfordert die Anwesenheit des entsprechenden Spliceosoms. Kommt es zu einer Hybridisierung der zu spleißenden pre-mRNA und des Antisense-Oligonucleotids wird die Anlagerung der Cofaktoren gestört. Als Folge dieser Blockade wird das Spleißen unterbunden. Leider hat dieser Mechanismus bisher nicht zu den gewünschten Inhibitionsraten geführt (Crooke, 2000; Goodchild, 1988). Als Ursache wird die schlechte Zugänglichkeit des Zellkerns diskutiert. So sind fast alle Antisense-Oligonucleotide gegen mRNA Zielsequenzen im Cytoplasma gerichtet.

Sterische Blockade der Translation

Ein möglicher Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden auf der Ebene der Translation ist die sterische Blockade des Translationsstarts (AUG-Codon). Der gebildete DNA/RNA-Duplex verhindert die Anlagerung des Ribosoms und wichtiger Initiationsfaktoren. Aufgrund dieser Blockade ist im Falle von eukariotischer mRNA z. B. eine Störung der Interaktion zwischen dem Translationsfaktor 4F und der mRNA denkbar (Lawson, 1986; Walder, 1988). Erfolgt trotzdem der Translationsstart, ist die erforderliche Translokation des Ribosoms entlang der RNA durch das hybridisierte Antisense-Oligonucleotid gestört. Im Endeffekt dissoziiert das Ribosom von der RNA ab und ein nicht fertig translatiertes Peptid wird freigesetzt und abgebaut. Die größte Effizienz der Antisense-Oligonucleotide mittels sterischer Hinderung, konnte durch die Blockade des AUG-Startcodons erzielt werden.

Inhibierung mittels Ribonuclease H Aktivierung

Ein wesentlicher Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden ist die Aktivierung der zellulären Ribonuclease H (RNase H). Dieses Enzym ist in der Zelle für den Abbau von RNA-Primern bei der DNA-Replikation oder für das Herausschneiden von fehleingebauten RNA-Nucleotiden in die DNA verantwortlich. Die RNase H spaltet in Gegenwart von bivalenten Kationen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} selektiv den RNA-Strang von DNA/RNA-Duplexen. Die degradierte RNA wird danach rasch von Exonucleasen vollständig abgebaut, während intakte mRNA-Einheiten eine 5'-Maskierung (CAP) und spezielle 3'-Strukturen (z.B. Poly-A) aufweisen, die sie vor einem Exonucleaseabbau schützen (Kanaya, 1993). Bei diesem Wirkmechanismus ist es nicht dringend erforderlich das AUG-Startcodon zu blockieren. Ein postulierter Mechanismus der Hydrolyse eines RNA-Stranges in einem DNA/RNA-Heteroduplex durch die *E. coli* RNase H1 ist in Abb. 2.4 dargestellt. Bei der katalytischen Reaktion erfolgt der nucleophile Angriff an der Phosphordiestergruppe durch ein Hydroxylion unter Hydrolyse der P-O-3'-Bindung (Kanaya, 1993). Durch die Hydrolyse wird die Bindungsfestigkeit des Antisense-Oligonucleotids an die mRNA stark reduziert, so dass das Oligonucleotid dissoziiert und für die erneute Bindung an ein weiteres RNA-Molekül zur Verfügung steht. Dieser pseudokatalytische Prozess erklärt auch, warum bestimmte Oligonucleotid-derivate, die die RNase H nicht zu stimulieren vermögen, trotz hoher Bindungsaffinität nur als schwache Inhibitoren fungieren.

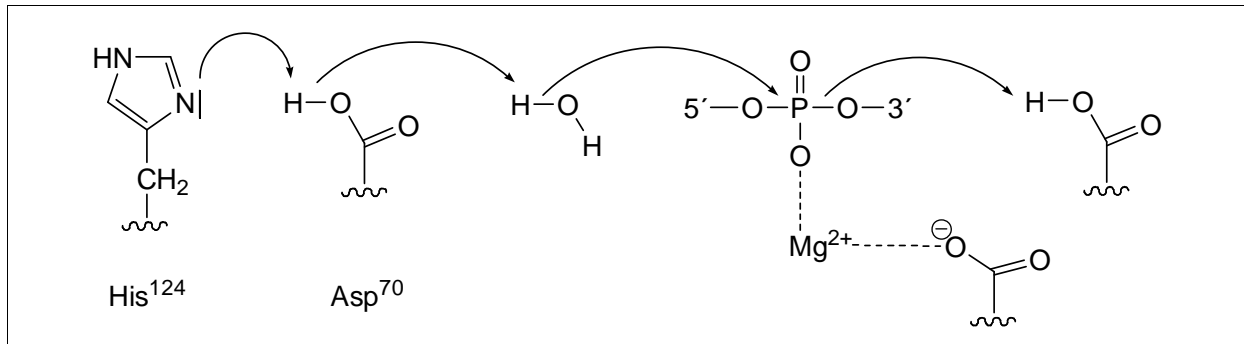


Abb. 2.5 Postulierter Mechanismus der Spaltung eines RNA-Stranges in einem DNA/RNA-Hybrid durch *E. coli* RNase H1 (His¹²⁴, Asp⁷⁰ = Histidin und Asparagin an Position 124 bzw. 70 des Proteins)

Die Wichtigkeit der RNase H induzierten Spaltung der mRNA wurde in zahlreichen Systemen nachgewiesen. Dazu gehören Weizenkeimextrakt, *Xenopus*-Oocyten, Hasen-Reticulozytenlysat und humane Leukämiezellen (Stein, 2002).

Bei diesen Untersuchungen zeigten sich in den verschiedenen Systemen große Unterschiede in der Aktivität des Enzyms. Während bei den beiden erstgenannten eine hohe RNase H Aktivität gefunden wurde, war diese in Reticulozytenlysaten deutlich niedriger oder fehlte gänzlich (Schlingensiepen, 1997). Walder und Walder fanden in frisch hergestelltem Reticulozytenlysat nur 1-2% der RNase H Aktivität der lebenden Zellen. Diese war jedoch für eine fast 100%ige Spaltung der RNA an der Hybridisierungsstelle eines komplementären Oligonucleotids ausreichend (Walder, 1988). Idealerweise sollte somit ein Antisense-Oligonucleotid das Startcodon blockieren und gleichzeitig die RNase H aktivieren, um eine bestmögliche Inhibierung zu gewährleisten.

2.3.2 Kriterien an Antisense-Oligonucleotide

Es hat sich herausgestellt, dass das Antisense-Konzept nur in Verbindung mit modifizierten Oligonucleotiden anwendbar ist (Agrawal, 1999). Dabei spielt die Art der Modifikation, die Häufigkeit der Modifikation (voll- oder partiell-modifizierter Strang) wie auch die gewählte Zielsequenz eine entscheidende Rolle. Die modifizierten Oligonucleotide müssen eine Vielzahl von Eigenschaften erfüllen, um als Therapeutika einsetzbar zu sein. In Abbildung 2.6 sind einige wesentliche Kriterien von Antisense-

Oligonucleotiden aufgeführt, die bei der Einführung neuer Substanzen berücksichtigt werden müssen.

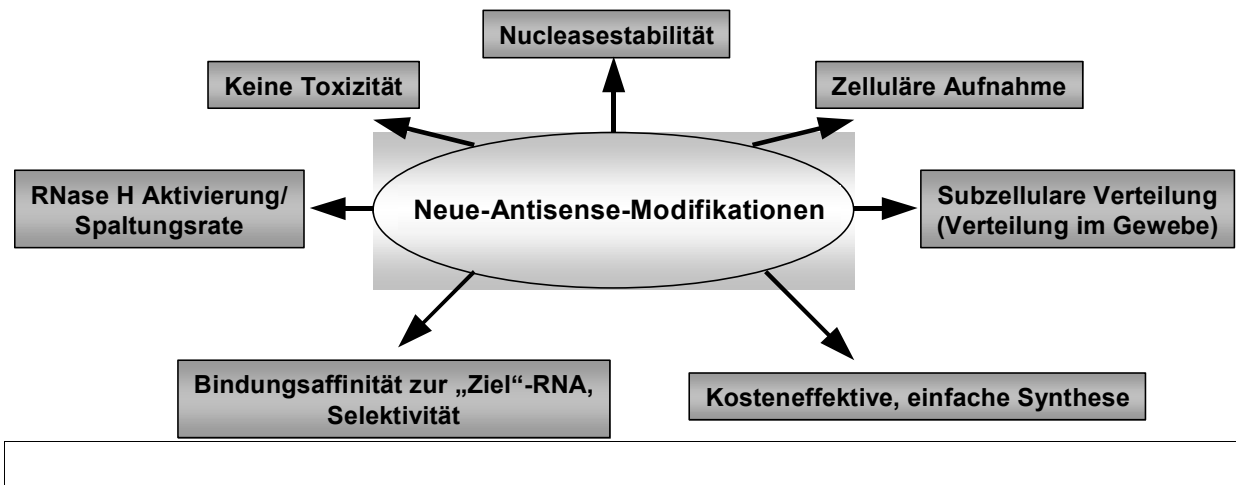


Abb. 2.6 Wichtige Kriterien an Antisense-Oligonucleotide für den Einsatz als Therapeutika

Nucleasestabilität

Ein entscheidender Punkt für die Anwendbarkeit von Antisense-Oligonucleotiden als Therapeutika ist deren Stabilität gegenüber Nucleasen unter *in vitro*- als auch darauffolgend unter *in vivo*-Bedingungen. Unmodifizierte Oligonucleotide werden in Seren wie auch in Zellen rasch, aber unterschiedlich schnell abgebaut. Dieser Abbau erfolgt durch Endo- und Exonucleasen (Eder, 1991). So sind z.B. Oligonucleotide in Reticulozytenlysat und in mit 5% fötalem Kälberserum modifiziertem Dulbecco's Medium nach 2 Stunden noch größtenteils intakt. Im Gegensatz dazu kommt es in HeLa-Zelllysaten im gleichen Zeitraum zu einem vollständigen Verdau der Oligonucleotide. Dieser wird in Rinderserum bereits nach 15 Minuten erzielt (Wickstrom, 1986). Eine Erhöhung der Stabilität bis hin zur Resistenz gegenüber Nucleasen konnte durch modifizierte Oligonucleotide erzielt werden (Crooke, 2000). So erhält man u.a. mittels Rückgrat modifizierten Phosphorthioaten (Crooke, 1995; Stein, 1991), Methylphosphonaten (Miller, 1991) und Benzylphosphonaten (Caselmann, 1997) eine deutliche Stabilisierung gegenüber Phosphodiesterasen. In vielen Seren wurde annähernd eine Resistenz der Antisense-Oligonucleotide gegen den enzymatischen Abbau beobachtet. Um diesen Effekt zu erzielen genügt es, wenn die beiden letzten Phosphordiesterbrücken am 3'- wie auch am 5'-Ende modifiziert werden. Erste Stabilitätsuntersuchungen werden in den meisten Fällen mit der Exonuclease Schlangengiftphosphodiesterase sowie den Endonucleasen S1 und der Milzphosphodiesterase durchgeführt. Wird das Antisense-

Oligonucleotid *in vitro* bzw. *in vivo* getestet, erfolgen die Stabilitätsuntersuchungen in den jeweiligen Seren und Kulturmedien.

Bindungsaffinität zur „Ziel“-RNA/Selektivität

Ein weiterer entscheidender Punkt für die Einsetzbarkeit eines Antisense-Oligonucleotides ist die stabile und selektive Hybridisierung an die mRNA oder virale RNA. Das Oligonucleotid sollte dabei eine Länge von 15-25 Nucleotiden besitzen, um eine hohe Selektivität zu gewährleisten, da ab dieser Länge die Sequenz statistisch einmalig im Genom ist. Neben der Oligonucleotidlänge ist auch die Anzahl der Modifikationen von Bedeutung. Vollständig modifizierte Phosphorthioate zeigen z.B. in einigen Fällen unspezifische Nebenwirkungen (Stein, 1993; Milligan, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Reduzierung des Thioatanteils auf 40% bis 60% die unerwünschten Effekte deutlich verringert werden, die Nucleasestabilität wie auch die Hybridisierungseigenschaften dagegen nahezu identisch bleiben (Peymann, 1997; Uhlmann, 1999). Neben der Modifikationsart ist auch die Wahl der Zielsequenz von entscheidender Bedeutung. In funktionellen Bereichen von mRNA oder viraler RNA wie etwa ribosomalen Bindungsstellen treten häufig Sequenzhomologien mit anderen Genen auf. Ist die genomische Basensequenz jedoch vollständig geklärt, lassen sich solche Effekte leicht durch computergestützte Sequenzvergleiche ausschließen. Besonders bei Viren ist es vorteilhaft besonders hochkonservierte Bereiche des Genoms als Ziel zu wählen, da diese für die Viren meistens von entscheidender Bedeutung sind. Von intensiv untersuchten Viren wie HIV oder dem Hepatitis C Virus (HCV) sind solche Bereiche bekannt (Kap. 4.2). Hochkonservierte Bereiche beinhalten jedoch eine große Anzahl an stabilen Sekundär- und Tertiärstrukturen wie Haarnadelschleifen (engl.: *hairpins*), interne Schleifen (engl.: *loops*), Ausbuchtungen (engl.: *bulge*) und Pseudoknoten (engl.: *pseudoknots*). Aus entropischen Gründen bilden sich jedoch in vielen Fällen die Heteroduplexe auf Kosten der RNA-Eigenstruktur. Dieser Effekt kann mittels stabiler Modifikationen wie Peptidnucleinsäuren oder 2'-O-Methylmodifikationen gefördert werden (Corey, 2002). Um die geeignetsten Hybridisierungsstellen zu ermitteln, gibt es diverse Ansätze. Ding und Lawrence nutzten Algorithmen sowie thermodynamische Daten und strukturelle Eigenschaften von RNA um die geeignetste Zielsequenz zu bestimmen (Ding, 2001). Sczakiel et al. verwendete eine ähnliche Methode, um effektive Oligonucleotide zu finden. Nach der computergestützten Sekundärstrukturbestimmung führte er systematische Reihenuntersuchungen von lokalen Bereichen der RNA durch und kreierte damit effektivere Antisense-

Oligonucleotide. Unter Verwendung dieser Methode zeigten 17 von 34 in der Praxis getesteten Oligonucleotide eine signifikante Inhibierung (>50%) der ICAM-1 Genexpression in Säugerzellen (Sczakiel, 2000; Scherr, 2000; Patzel, 1999). Andere Methoden beruhen auf der Berechnung von Schmelztemperaturen oder freien Energien der sich bildenden DNA/RNA-Duplexe (Ding, 1999). Zudem werden zahlreiche kombinatorische Methoden eingesetzt, um die ideale Hybridisierungsstelle zu ermitteln.

Zelluläre Aufnahme von Oligonucleotiden

Eine weitere Hürde für die Aktivität von Antisense-Oligonucleotiden ist die Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran (Hughes, 2000). Der genaue Mechanismus der Aufnahme ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Es zeigte sich, dass die Aufnahme von der Temperatur (Yakubov, 1989), der Struktur, der Konzentration (Vlassov, 1994) und der Zelllinie abhängt. Zudem fand man, dass die intrazelluläre Konzentration an Oligonucleotid umgekehrt proportional zu dessen Länge ist und die Zellaufnahme somit von der Länge des Oligonucleotids abhängt (Loke, 1989). In den meisten bis heute veröffentlichten Arbeiten zur Zellaufnahme werden Endocytoseprozesse für geladene wie ungeladene Oligonucleotide favorisiert (Juliano, 1999). Dabei erfolgt primär eine Bindung niedriger Affinität an bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche. Für unmodifizierte Oligonucleotide und Phosphorthioate wird eine Aufnahme über die Rezeptor vermittelte Endocytose angenommen (De Diesbach, 2000). Für ungeladene Oligonucleotide wie Methylphosphonate wird eine Zellaufnahme mittels Flüssigphasenendocytose vorgeschlagen (Levis, 1995). Ein generelles Problem der Aufnahme über Endocytose besteht aber darin, dass ein Grossteil der Oligonucleotidmenge nicht frei im Cytoplasma, sondern in bestimmten Zellstrukturen, den Lysosomen und Endosomen, eingeschlossen vorliegt. Dadurch ist die Konzentration an freiem Oligonucleotid, das tatsächlich für die Hybridisierung an die mRNA zur Verfügung steht, stark herabgesetzt. Zahlreiche Strategien die Zellaufnahme von Oligonucleotiden zu verbessern, sind in den vergangenen Jahren entwickelt worden. Dazu zählen:

- Reduzierung des anionischen Charakters und gleichzeitige Erhöhung der Lipophilie, indem lipophile Rückgratmodifikationen wie Methyl- und Benzylphosphonate eingesetzt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Punkt aufgegriffen, indem neue, lipophilere Modifikationen synthetisiert wurden.

- Nutzung körpereigener Transportmechanismen durch kovalente Verknüpfung mit Gallensäurederivaten (Lehmann, 2001; Lehmann, 2001b; Starke, 2001; Kramer, 1999).
- Anknüpfung von kationischen Polyaminen wie Spermine- und Spermidinmodifikationen (Manoharan, 2002).

Neben der Verwendung von modifizierten Oligonucleotiden kommen auch sehr häufig nichtvirale und virale Vektoren für den Nucleinsäuretransport zum Einsatz. Die größte Bedeutung unter den nichtviralen Vektoren für den Transport ins Cytoplasma kommt den kationischen Liposomen, sogenannten „uptake enhancern“, zu (Jen, 2000). Kationische Liposomen können aus einem einzelnen kationischen Amphiphil oder einem Cytofectin gebildet werden. Üblicher ist jedoch eine Kombination aus einem Cytofectin und einem neutralen Lipid. Häufig, wie auch in dieser Arbeit, kommt Lipofektin® zum Einsatz. Die Komponenten dieses kationischen Liposoms sind in Abbildung 2.7 abgebildet.

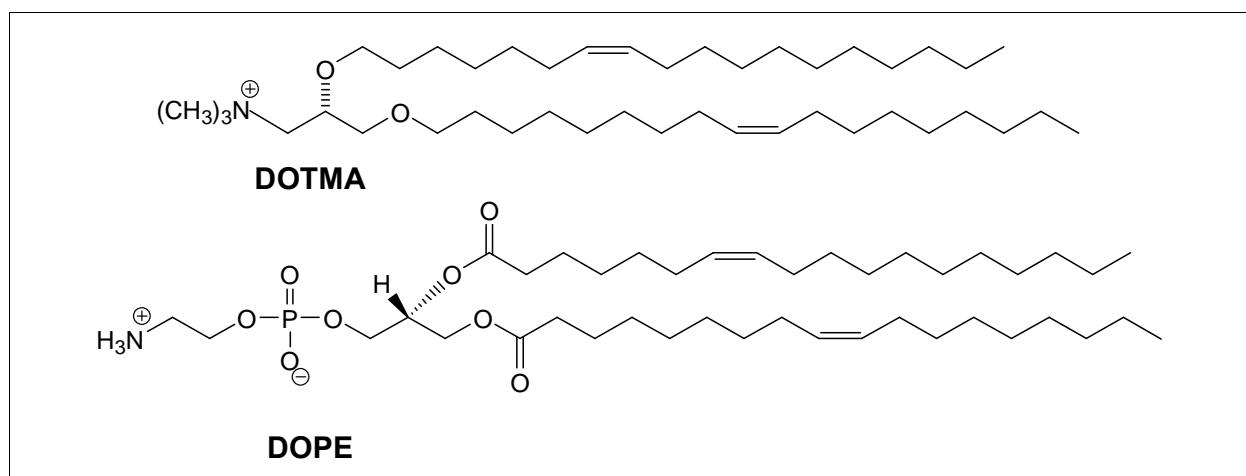


Abb. 2.7 Komponenten des „uptake enhancers“ Lipofektin®

Das Produkt setzt sich aus dem Cytofectin *N*-[(1,2,3-Dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und dem natürlich vorkommenden Lipid 1,2-Dioleoyl-*syn*-glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE) im Verhältnis 1:1 zusammen (Felgner, 1987). Darüber hinaus gibt es heute mehr als 20 neue Liposomensysteme, die sich in der Regel aus der Kombination eines neuen, synthetischen Cytofectins mit DOPE zusammensetzen (Cooper, 1998; Bowe, 1997). Weiterhin werden auch Dendrimere (Weber, 2000) und Nanopartikel (Schwab, 1994; Fattal, 1998) für den nichtviralen Transport verwendet.

Virale Gentransfervektoren erhält man durch Einbringen von therapeutischer DNA in das Virusgenom. Das virale Genom wird dabei zumeist verkleinert, so dass es nicht mehr pathogen ist. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Effizienz und Spezifität. Die ernstzunehmenden Nachteile bestehen in der Gefahr einer Immunreaktion mit schon vorhandenen Wildtyp-Antikörpern des viralen Vektors und der Aktivierung endogener, virusähnlicher Sequenzen. Retrovirale Vektoren können zudem in der Regel nicht mehr als 8 kBp Fremd-DNA aufnehmen (Weber, 2000).

RNase H Aktivierung/Spaltungsrate

Da die RNA-Spaltung durch die RNase H einen wichtigen Wirkungsmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden darstellt (siehe Kap. 2.3.1), sollten chemisch modifizierte Oligonucleotide dieses Enzym nach der Hybridisierung aktivieren. Während dies z.B. für Phosphorthioate der Fall ist, aktivieren Methylphosphonate, Peptidnucleinsäuren (PNAs), 2'-O-Methyloligoribonucleotide, Morpholino oligonucleotide und α -anomere Oligonucleotide die RNase H nicht (Dias, 2002; Milligan, 1993).

Für Phosphorthioate findet man aber auch eine Abhängigkeit der RNase H Aktivierung von der Stereochemie am Phosphor (Lebedev, 1996). Bei teilmodifizierten Oligonucleotiden konnte festgestellt werden, dass bereits die Ausbildung von 5-6 Basenpaaren genügt, um eine Induzierung der RNase H Aktivität zu erzielen (Monia, 1993; Uhlmann, 1990). Bei Phosphordiester-Phosphorthioat-Chimären führt dies leider zu einer teilweise unspezifischen Wirkung dieser Oligonucleotide. Chimäre Oligonucleotide aus Methylphosphonaten oder anderen nicht die RNase H aktivierenden Modifikationen und einem Phosphordiester-Teil können zu einer substantiellen Erhöhung der Spezifität führen. Giles konnte mit Methylphosphonat-Phosphordiester-Chimären eine Selektivitätssteigerung der Ribonucleoase H Aktivität bis hin zur Erkennung von Punktmutationen erreichen, während Phosphodiester und Phosphorthioate allein eine solche Spezifität nicht aufweisen konnten (Giles, 1995).

Pharmakokinetik/Verteilung im Gewebe

Pharmakologisch am besten untersucht sind die Phosphorthioate, da sich die meisten Antisense-Oligonucleotide dieser Substanzklasse zuschreiben lassen. Die Studien werden in den meisten Fällen mit Fluoreszenz- bzw. ^{32}P -markierten, besser aber mit ^{35}S - oder Nucleobasen-markierten Oligonucleotiden durchgeführt. Nach Verabreichung durch intravenöse Infusion binden sie relativ schnell, aber mit geringer Affinität, an Serumalbumin und andere Serumproteine. Hierdurch bildet sich im Prinzip ein Reservoir,

wodurch die schnelle Ausscheidung verhindert wird. Die Verteilung der Phosphorthioate erfolgt relativ rasch (<1h) über das gesamte periphere Gewebe (Geary, 2001). Die stärkste Anreicherung findet sich in der Leber, Niere, Rückenmark, Skelettmuskel und der Haut. Neben der intravenösen Gabe sind am Tier subkutane, intraperitoneale, intravitreale, intranasale, intradermale, intrazerebrale und intratumorale Applikationen beschrieben. In ersten Untersuchungen ist es bei bestimmten Modifikationen auch gelungen eine orale Bioverfügbarkeit zu erreichen. Die Eliminierung aus dem Körper erfolgt relativ langsam (1 bis 4 Tage). Die Primärroute der Ausscheidung ist der Urin und in geringeren Mengen auch der Kot (Agrawal, 1995). Die untersuchten Oligonucleotide waren teilweise - bevorzugt von 3'-Exonucleasen – abgebaut (Temsamani, 1997).

Keine Toxizität

Auch in diesem Zusammenhang sind die Phosphorthioate am Besten untersucht (Levin, 2001; Crooke, 2000). In Nagetieren wurde dabei als stärkste Nebenwirkung die Freisetzung von Cytokinen festgestellt, insbesondere wenn in den untersuchten Oligonucleotiden das Sequenzmotiv CpG auftrat (Bennett, 1998; Agrawal, 1998). An Affen wurde neben der Störung der Blutgerinnung auch eine blutdrucksenkende Wirkung beobachtet. Zudem kam es zu einer Aktivierung des Immunsystems. Am Menschen wurden nach mehrwöchiger intravenöser Gabe von 2 mg Phosphorthioat pro kg Körpergewicht und Tag keine signifikanten Nebenwirkungen festgestellt (Uhlmann, 1998).

Kosteneffektive und einfache Synthese

Noch vor wenigen Jahren schienen die Herstellbarkeit von Oligonucleotiden im großen Maßstab und der Herstellungspreis limitierend für eine therapeutische Anwendung dieser Substanzklasse zu sein. Heute können z.B. die Phosphorthioate im Kilogramm- und wohl bald auch im Tonnenmaßstab produziert werden. In der Regel erfolgt die Synthese nach der Phosphoramiditmethode nach Caruthers (Beaucage, 1993; Caruthers, 1987). Neue modifizierte Antisense-Oligonucleotide sollten aus diesem Grund über die Phosphoramiditmethode synthetisiert werden können. Selbstredend müssen die Oligonucleotide leicht über Chromatographie aufreinigbar, stabil und lagerfähig sein.

2.3.3 Chemische Modifikationsmöglichkeiten

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert, unterliegen unmodifizierte Antisense-Oligonucleotide im Blutserum und im Cytosol einem raschen enzymatischen Verdau durch Nucleasen. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die 3'-Exonucleaseaktivität. Mit Hilfe von chemisch modifizierten Oligonucleotiden lässt sich dieser Abbau verlangsamen bzw. sogar unterbinden. Abbildung 2.8 zeigt die möglichen Modifikationsstellen in Oligonucleotiden die zur Verfügung stehen. Auf die gebräuchlichste und effektivste Methode - die Modifikation des Phosphatrückgrats - wird in Kapitel 3 näher eingegangen.

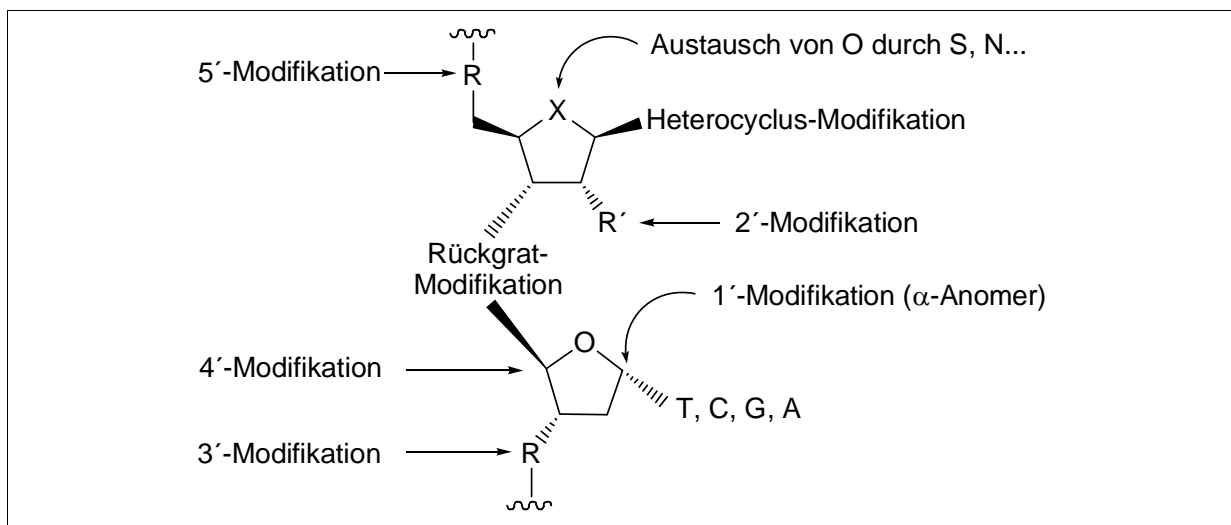


Abb. 2.8 Positionen für die Modifikation von Oligonucleotiden

Die Vorteile anderer Modifikationen liegen u.a. in der Erhöhung der Affinität zur RNA-Zielsequenz oder der besseren zellulären Aufnahme. Auf dem Gebiet der Heterocyclenmodifikationen liegt die Limitierung darin, dass die Modifikation eine stabile Basenpaarung mit einer natürlichen Nucleobase eingehen können muss. Es sind in der Zwischenzeit einige Basenmodifikationen gefunden worden, die sich für den Antisense-Einsatz eignen (Herdewijn, 2000; Sanghvi, 1993). In diesem Zusammenhang seien u.a. das 5-Methyl- und 5-Bromcytosin, das 5-(1-Propinyl)-2'-desoxyuridin (Froehler, 1992), das Pseudouridin, das Phenoxazin (Flanagan, 1999) und die 2,6-Diaminopurine erwähnt. All diese Modifikationen erhöhen die Affinität zur mRNA und aktivieren zum Teil auch die RNase H. Um eine Resistenz gegenüber Nucleasen zu erzielen werden zusätzlich Phosphorthioate eingesetzt.

Eine deutliche Erhöhung der Affinität zu mRNA konnte auch durch den Einsatz von α -anomeren Oligonucleotiden erzielt werden (Debart, 1992; Morvan, 1991). Diese zeigen sich zudem resistent gegenüber Nucleasen und inhibieren die Translation in Zelllysaten. Eine Aktivierung der RNase H durch α -anomere Oligonucleotide konnte nicht festgestellt werden.

Für den Antisense-Einsatz zeigen auch Morpholino-, Peptid- (PNA) und Locked- (LNA) Nucleinsäuren interessante Eigenschaften (Abb. 2.9). Bei LNA's und Morpholinos handelt es sich um Zucker modifizierte Oligonucleotide während bei PNA's das gesamte Zucker-Phosphatrückgrat durch eine Peptidkette ersetzt wird. Die LNA's wurden 1998 erstmals von Wengel und Imanishi synthetisiert (Wengel, 1998; Imanishi, 1998). Die LNA's besitzen eine Methylenbrücke, die den 2'-Sauerstoff der Ribose mit dem 4'-Kohlenstoff verbindet. Dies führt zu einer fixierten 3'-*endo* Konformation. Der Einsatz von „Locked“-Nucleotiden führt zu einer signifikanten T_m -Wert-Erhöhung in LNA/RNA-Duplexen von 4-8°C pro Modifikation im Vergleich zu natürlichen DNA/RNA-Duplexen.

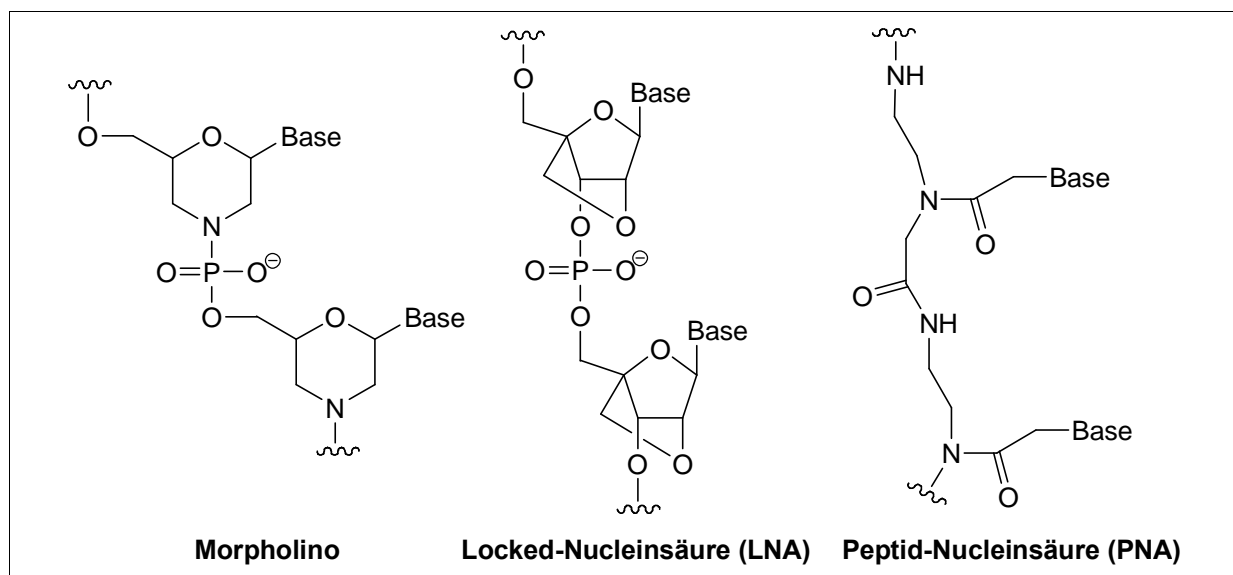


Abb. 2.9 Zuckermifikationen von Nucleinsäuren

Ferner sind LNA-Oligonucleotide stabil gegenüber Nucleasen und in der Lage die RNase H zu aktivieren (Leumann, 2002; Braasch, 2001). Bei den PNAs handelt es sich um Oligonucleotide, in denen das Zucker-Phosphatrückgrat durch ein *N*-Aminoethylglycin Polyamid ersetzt ist. Wie auch bei den LNAs erhöhen die PNAs die Affinität zum jeweiligen DNA- oder RNA-Strang deutlich und erweisen sich als sehr stabil gegenüber Nucleasen und Peptidasen. Die PNAs sind jedoch nicht in der Lage die RNase H zu aktivieren. Ferner ist die zelluläre Aufnahme gering. Aus diesem Grund werden häufig

PNA-DNA-Chimäre als Antisense-Oligonucleotide eingesetzt (Corey, 2002; Larson, 1999). Die Morpholino modifizierten Oligonucleotide sind nicht in der Lage die RNase H zu aktivieren (Summerton, 1999; Summerton, 1997). Aufgrund ihrer hohen Affinität zur „Ziel“-RNA kommt es durch die Blockade des AUG-Startcodons jedoch zu einer sehr hohen Inhibierung der Genexpression, was bereits in einigen Modellorganismen wie dem Zebrafisch und der Maus gezeigt werden konnte (Heasman, 2002; Corey, 2001).

Von den weiteren diversen Zuckermodifikationen seien hier die Hexapyranosylderivate (HNA) (Hendrix, 1997) und die 2'-substituierten Oligonucleotide erwähnt. Von der letzteren Verbindungsklasse sind die 2'-Fluor-2'-desoxyribonucleoside (Kawasaki, 1993), die 2'-O-Methylribonucleoside und die 2'-O-Allylribonucleoside von besonderem Interesse, da diese eine deutliche Stabilisierung der Duplexe hervorrufen (Freier, 1997). Für genauere Informationen sei auf folgende Übersichtsartikel verwiesen (Eckstein, 2000; Engels, 2000; Gat 1998; Bennet, 1998; Crooke, 1996; Agrawal, 1995; De Mesmaeker, 1995; Uhlmann, 1990).

2.3.4 Therapeutische Anwendungen

Als erstes Antisense-Oligonucleotid wurde 1998 Formivirsin® als Medikament zugelassen. Das vollmodifizierte 21mer Phosphorthioat hemmt die Vermehrung des humanen Cytomegalievirus (CMV), welches bei vielen AIDS Patienten eine opportunistische Infektion des Auges verursacht und oft zur Erblindung führt. Zurzeit befinden sich noch zahlreiche Antisense-Oligonucleotide gegen verschiedene Krankheiten in der klinischen Prüfung am Menschen (Tab. 2.1).

Bis auf wenige Ausnahmen handelt es sich dabei um Phosphorthioate der ersten Generation. Im Falle von „Gem.92“ und „Gem.132“ handelt es sich um chimäre Antisense-Oligonucleotide der zweiten Generation aus Phosphorthioat und 2'-O-Methyl-RNA und bei „Resten-NG“ um ein Morpholino-Oligonucleotid. Die Anwendung von Oligonucleotiden gegen Krebskrankheiten ist zum heutigen Zeitpunkt aufgrund ihrer hohen Spezifität im Vergleich zu konventionellen Chemotherapeutika eindeutig favorisiert. Zudem ist bei diesem Ansatz mit viel geringeren Nebenwirkungen zu rechnen. Die klinische Erprobung von Oligonucleotiden ist jedoch zum heutigen Zeitpunkt noch aufwendiger als die niedermolekularer Verbindungen. Mit großen Patientenzahlen werden zurzeit einige Oligonucleotide gegen solide Tumore getestet. So

befinden sich die Oligonucleotide „Affinitac“ (gegen Protein-Kinase-C- α) in Phase III und „ISIS 5132“ (gegen raf-1-Kinase-mRNA) in Phase II. Weiterhin befinden sich Oligonucleotide zur Verhinderung der Restenose nach Ballondilatation verengter Blutgefäße sowie gegen Asthma in der Prüfung am Menschen. Ebenfalls bereits in fortgeschrittener klinischer Prüfung befindet sich ein entzündungshemmendes Antisense-Oligonucleotid („Alicaforsen“), das die Expression von ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) unterdrückt. ICAM-1 soll unter anderem die Wanderung von Leukozyten aus dem Blutgefäß in das umgebende Gewebe von Entzündungsherden stimulieren.

Tab. 2.1 Auswahl an Antisense Oligonucleotiden in klinischen Studien (Dove, 2002; Opalinska, 2002; Corey, 2002), *Ribozyme.

Ziel-RNA	Produkt	Indikation	Status	Firma
IE2	Formiviren®	CMV-Retinitis	zugelassen	ISIS
PKC- α	Affinitac	Krebs- NSCLC, NHL	Phase III	ISIS
Bcl-2	Genasense	Krebs	Phase III	Genta
ICAM-1	Alicaforsen	Crohn's Krankheit	Phase III	ISIS
c-myc	Resten-NG	Restenose	Phase III	AVI BioPharm.
Bcl-2	G3139	NHL	Phase II/III	ISIS
A1 Rezeptor	EPI 2010	Asthma	Phase II	EpiGenesis
c-myc	LR 3280	Restenose	Phase II	Lynx
Antiviral	Isis 14803	Hepatitis C	Phase II	ISIS
CMV	Gem.132	CMV-Retinitis	Phase II	Hydridon
Antiviral	HGTV	AIDS	Phase II	Enzo Biochem
ISIS 5132	C-Raf	Krebs	Phase II	ISIS
ISIS 2503	H-ras	Krebs	Phase II	ISIS
HIV	Gem.92	AIDS	Phase I	Hydridon
VEGFR1*	Angiozyme	Krebs	Phase I/II	RPI
Antiviral*	Heptazyme	Hepatitis C	Phase II	RPI

Ein Antisense-Oligonucleotid gegen das Hepatitis C Virus befindet sich in der klinischen Phase II. Gegen dieses Virus kann man sich bislang weder immunisieren lassen noch steht eine effiziente Therapie zur Verfügung (siehe Kap. 4.1). Die Inhibierung der viralen RNA des Hepatitis C Virus mit lipophilen, spezifischen Antisense-Oligonucleotiden ist u.a. Thema dieser Arbeit.

Es ist zu erwarten, dass in den kommenden Jahren eine Reihe der heute in klinischer Prüfung befindlichen Antisense-Oligonucleotide und Ribozyme eine Zulassung als Arzneimittel erhalten.

3 Rückgratmodifikationen

Für den Einsatz als Therapeutika haben sich vor allem Rückgrat modifizierte Antisense-Oligonucleotide etabliert. Die chemische Veränderung der Phosphordiesterbrücke stellt die einfachste Methode dar eine Resistenz gegenüber Nucleasen zu erzielen. Ferner lassen sich noch andere wichtige Antisense-Eigenschaften wie die Bindungsaffinität zur „Ziel“-RNA und die zelluläre Aufnahme durch diese Modifikationen verbessern. Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die diversen Möglichkeiten das Phosphatrückgrat zu modifizieren. Bei der Variante 1 wird ein nicht bindender Sauerstoff durch einen polaren oder unpolaren Substituenten ersetzt.

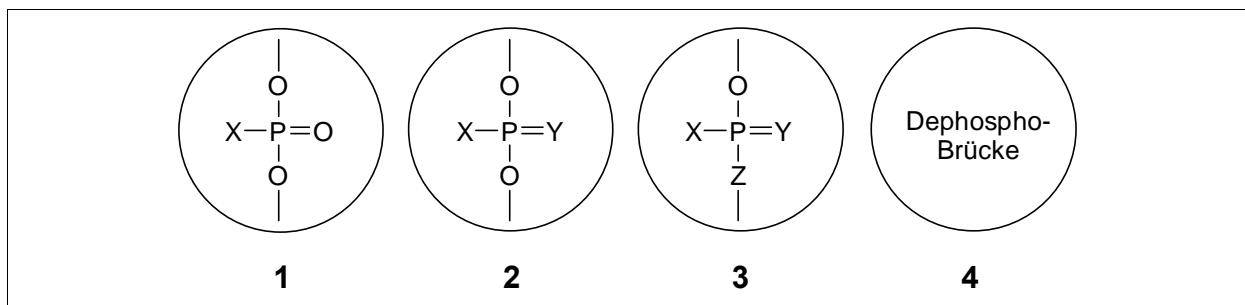
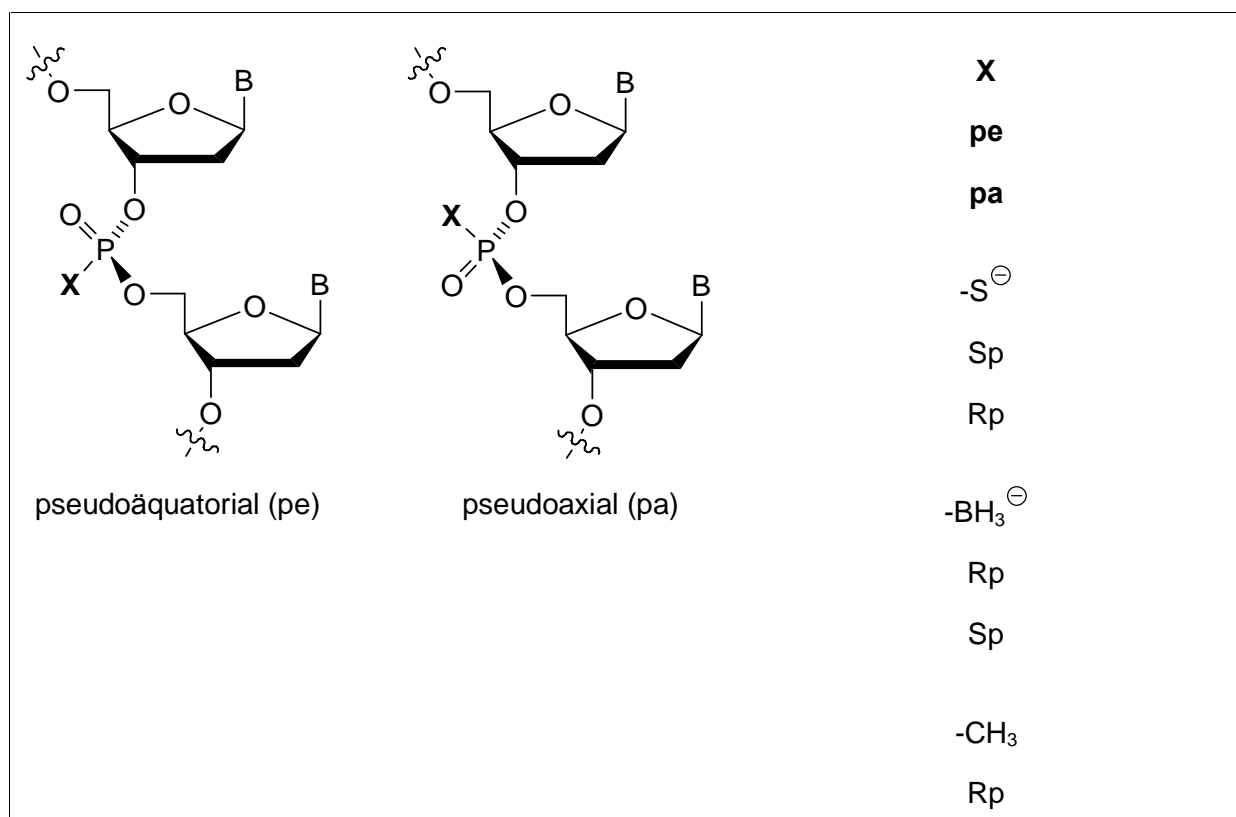


Abb. 3.1 Möglichkeiten der Rückgratmodifikation

Alle während dieser Arbeit synthetisierten Modifikationen beruhen auf dieser Möglichkeit. Die wichtigsten schon publizierten Modifikationen werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Für die Varianten **2** (z.B. Phosphordithioate), **3** (z.B. 3'-Methylenphosphordithioate) und **4** (z.B. Amid-, Carboxyl-, Carbamat- und Peptid-Nucleinsäuren) sei auf die Übersichtsartikel verwiesen (Micklefield, 2001; Freier, 1997; De Maesmaeker, 1995; Uhlmann, 1990).

3.1 Konfiguration der Rückgrat-Modifikation

Durch den Ersatz eines nichtbindenden Sauerstoffs am Phosphatrückgrat durch eine andere Gruppe ergeben sich jeweils zwei Diastereoisomere. Ein Oligonucleotid mit n modifizierten Phosphordiesterseinheiten besteht somit aus 2^n Diastereoisomeren. Bei der automatisierten Festphasensynthese (Amiditmethode) entstehen die Isomerenpaare jeweils etwa im Verhältnis 1:1. In Abbildung 3.2 sind einige Modifikationen mit den entsprechenden absoluten Konfigurationen dargestellt.



	Sp
	-Benzyl
	Rp
	Sp
	-(CH ₂) _n -Aryl
	Rp
	Sp
	-OEt
	Sp
	Rp
	-OiPr
	Rp
	Sp

Abb. 3.2 Zuordnung der absoluten Konfiguration (Rp bzw. Sp) Rückgrat modifizierter Oligonucleotide (CIP-Nomenklatur)

Der Substituent befindet sich entweder in der pseudoäquatorialen oder in der pseudoaxialen Position. Je nach Substituent ergeben sich durch die verschiedenen Prioritäten nach der CIP-Nomenklatur unterschiedliche absolute Konfigurationen (Sp oder Rp). So befindet sich bei den Thioaten das Sp-konfigurierte Isomer in der pseudoäquatorialen Position und das Rp-konfigurierte in der pseudoaxialen. Im Falle der Methyl- und Benzylphosphonate wechselt die absolute Konfiguration aufgrund der niedrigeren Priorität dieser Gruppen gegenüber Sauerstoff und Schwefel (Abb. 3.2). Die Diastereoisomeren unterscheiden sich in Eigenschaften wie ihrem Verhalten gegenüber Enzymen sowie der Hybridisierung an DNA- oder RNA-Gegenstränge signifikant. Welche der beiden Konfigurationen dabei eine höhere Bindungsaffinität aufweist variiert von Modifikation zu Modifikation. Im Falle von Phosphorthioaten, Methylphosphonaten, Octylphosphonaten und Benzylphosphonaten zeigen die Duplexe mit Rp-konfigurierten

Modifikationen höhere Schmelztemperaturen als die mit Sp-konfigurierten Modifikationen. Bei den Phenylphosphonaten wechselt hingegen die Stabilitätsreihenfolge. In der Regel können bei einfach modifizierten Oligonucleotiden die Isomeren mittels RP-HPLC getrennt werden. Bei höheren Modifikationsgraden werden die Diastereoisomerengemische eingesetzt. Die chemische Synthese isomerenreiner Oligonucleotide ist bis zum heutigen Tage nur unter erheblichem Aufwand möglich.

3.2 Phosphorthioate

Phosphorthioat modifizierte Oligonucleotide wurden erstmals 1969 dargestellt (DeClercq, 1970; Eckstein, 1983). Formal erhält man Phosphorthioate durch Substitution eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms der Phosphordiestergruppe durch ein Schwefelatom. Die negative Ladung am Phosphatrückgrat bleibt dadurch erhalten, so dass Phosphorthioate ähnliche Eigenschaften wie ihr unmodifiziertes Pendant aufweisen. Die Darstellung der Phosphorthioate verläuft völlig analog zur Festphasensynthese nach der Amiditmethode (Abb. 1.4). Lediglich der Oxidationsschnitt wird durch eine Beschwefelung ersetzt. Die anfängliche Beschwefelung mittels S_8 wurde rasch durch das Beaucages Reagenz (3-*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid) (Iyer, 1990) oder Tetraethylthiuramdisulfid (Vu, 1991) ersetzt. Durch einen Wechsel zwischen Oxidation und Beschwefelung lassen sich auch problemlos teilmodifizierte Oligonucleotide herstellen. Phosphorthioate sind stabil gegen Nucleasen. Sowohl im Serum als auch in Zellkulturen erhöht sich die Halbwertszeit auf 12 bis 24 Stunden (Schlingensiepen, 1997; Crooke, 1996). Allerdings führt schon der Einbau einer Phosphordiester-Einheit zu einer signifikanten Verringerung der Serumstabilität. Einen entscheidenden Einfluss auf die Eigenschaften hat die absolute Konfiguration der Modifikation. Sp-konfigurierte Phosphorthioate werden spezifisch von den Nucleasen S1 und P1 hydrolysiert, während Rp-konfigurierte Thioate von der Schlangengift-Phosphodiesterase gespalten werden (Engels, 2000; Koziolkiewicz, 1997). Zudem zeigen rein Rp-konfigurierte Phosphorthioate höhere Schmelzwerte als Isomerengemische (Koziolkiewicz, 1995) und diese wiederum höhere T_m -Werte als die vollständig Sp-konfigurierten Thioate. Rein Rp-Phosphorthioate sind außerdem in der Lage die RNase H stärker zu aktivieren. Diese

Eigenschaften machen die Synthese diastereoisomerenreiner Oligonucleotide erstrebenswert. Die Methoden zur Synthese von isomerenreinen Phosphorthioaten an der festen Phase sind bislang nicht befriedigend (Lebedev, 1996; Stec, 1994). Ein weiterer Vorteil der Phosphorthioate gegenüber vielen anderen Modifikationen ist ihre Eigenschaft die RNase H zu aktivieren. Allerdings besitzen Phosphorthioate auch einige unerwünschte Eigenschaften, welche die Entwicklung neuer Strategien zur Modifikation von Antisense-Oligonucleotiden notwendig machten. Phosphorthioate tendieren z.B. dazu, unerwünschte, nicht spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen einzugehen. Häufig wird auch eine sequenzabhängige Bindung an Zelloberflächenproteine beobachtet, die zur Vortäuschung oder Übertönung der gewünschten Antisense-Effekte führt.

3.3 Methyl-, Phenyl-, Benzyl- und Octylphosphonate

Bei diesen Modifikationen wird ein nicht bindender Sauerstoff des Phosphatrückgrates durch eine Alkyl-, Aryl-, bzw. Arylalkylgruppe ersetzt. Durch die Substitution verliert das Oligonucleotid jeweils eine negative Ladung und somit einen Teil seines polyanionischen Charakters. Aufgrund dessen erhöht sich je nach Modifikationsart die Lipophilie der Oligonucleotide deutlich. Dadurch vermögen diese Oligonucleotide leichter passiv die Zellmembran zu penetrieren. Die absolute Konfiguration der Modifikation hat bei diesen Modifikationen einen stärkeren Einfluss auf die Eigenschaften als dies bei Phosphorthioaten der Fall ist. Im Rahmen dieser Verbindungsklasse wurden als erstes die Methylphosphonate im Jahre 1979 synthetisiert (Agarwal, 1979; Miller, 1979). Heute haben diese Synthesewege, die auf der Kopplung von geschützten Nucleosiden mit Derivaten der Methylphosphonsäure beruhen, praktisch keine Bedeutung mehr. Durchgesetzt hat sich der Einsatz der reaktiveren, dreiwertigen Phosphorverbindungen. Der Reaktionsweg, der zu den entsprechenden Phosphorylierungsreagenzien führt, ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

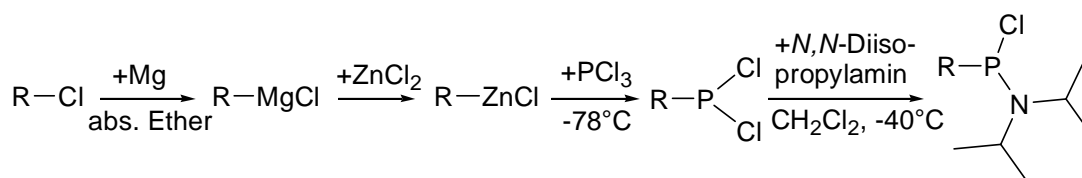


Abb. 3.3 Synthese alkyl- und arylalkylmodifizierter Phosphorylierungsreagenzien

Prinzipiell haben sich zwei Möglichkeiten für die Synthese alkyl- und arylalkylmodifizierter Oligonucleotide durchgesetzt. Die erste beruht auf einer Eintopfreaktion, indem ein geschütztes Nucleosid mit Dichloralkyl- bzw. Arylalkylphosphin bei tiefen Temperaturen umgesetzt wird (Abb. 3.4). Nach einigen Minuten wird dann das zweite geschützte Nucleosid zugegeben (Engels, 1982a; Engels 1982b; Samstag, 1992; Schweitzer, 1999). Nach der Oxidation des dreiwertigen Phosphors lassen sich die erhaltenen Diastereoisomeren gut trennen.

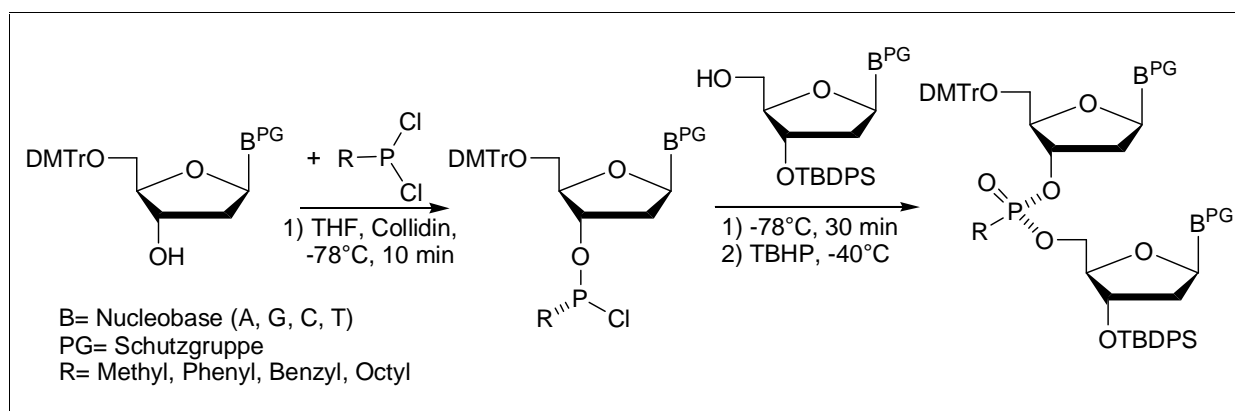


Abb. 3.4 Eintopfreaktion für die Synthese von alkyl- und arylalkylmodifizierten Oligonucleotid-Dimeren

Interessant ist hierbei, dass die bevorzugte Bildung des Rp-Isomers beobachtet wird. Der Einbau dieser diastereoisomerenreinen Dimere in längere Oligonucleotide ist mittels der Festphasensynthese möglich. Dazu wird selektiv die Schutzgruppe an der 3'-Position entfernt und die freie OH-Gruppe mit dem Standardphosphorylierungsreagenz umgesetzt.

Die zweite, heutzutage am häufigsten verwendete Methode ist die direkte Darstellung modifizierter Phosphoramidite für die Festphasensynthese (Abb. 3.5). Dabei wird ein geschütztes Nucleosid mit dem modifizierten Phosphorylierungsreagenz umgesetzt (Agrawal, 1987; Löschner, 1988; Lehmann, 2000). Die erhaltenen Verbindungen sind stabil und können chromatographisch aufgereinigt werden. Bei der Festphasensynthese

erhält man jedoch ein Gemisch aus Sp- und Rp-konfigurierten Diastereoisomeren im Verhältnis 1:1.

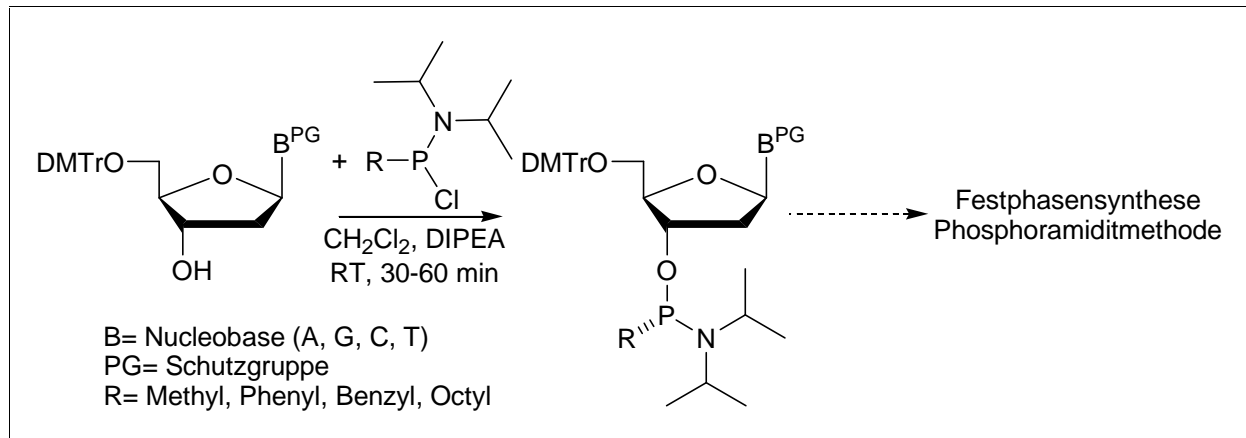


Abb. 3.5 Synthese von Alkyl- und Arylalkylphosphoramiditen für die automatisierte Oligonucleotid-Festphasensynthese

Aufgrund ihrer sehr guten Nucleasestabilität wurden Methylphosphonate bereits früh als Nucleinsäureanaloge für das Antisense-Konzept untersucht. Ein entscheidender Nachteil dieser Verbindungen ist jedoch die fehlende Aktivierung der RNase H, so dass der RNA-Strang in RNA/DNA-Duplexen von diesem Enzym nicht geschnitten wird. Durch eine Teilmodifizierung kann dieser Mangel eingeschränkt werden. Methylmodifikationen die Rp-konfiguriert sind, weisen höhere T_m -Werte auf als die mit Sp-Konfiguration (Schweitzer, 1999; Reynolds, 1996). Die Schmelztemperaturen der Duplexe liegen jedoch in beiden Fällen unter denen des unmodifizierten Mutterstranges. Für Rp-modifizierte Oligonucleotide konnte zudem eine intensivere Basenstapelung gefunden werden. In Lösung ist die Konformation der beiden Dimere nach wie vor einer DNA ähnlich (Schweitzer, 1999; Lebedev, 1993).

Octylphosphonate (Mag, 1996) wie auch Difluormethylphosphonate (Bergstrom, 1988) zeigen ähnliche Eigenschaften wie die Methylphosphonate. Auch hier weisen die Rp-modifizierten Oligonucleotide höhere T_m -Werte auf als die mit Sp-Konfiguration. Diese Tatsache ändert sich bei den Phenylphosphonaten. Bei diesen ist das Sp-konfigurierte Isomer stabiler als das Rp-konfigurierte (Mag, 1997; Hayakawa, 1995). Diese Modifikationstypen spielen jedoch für die Antisense-Anwendung keine Rolle.

Benzylphosphonate zeichnen sich gegenüber Methylphosphonaten durch eine deutliche Erhöhung ihrer Lipophilie aus. Diese Eigenschaft kann einen Einfluss auf die Zellaufnahme haben. Ihre Halbwertszeit bei enzymatischem Verdau erhöht sich auf das

Doppelte. Sie sind zudem in der Lage die RNase H in gewisser Masse zu aktivieren. Benzylphosphonate hybridisieren mit der komplementären RNA bzw. DNA stärker als die analogen Methylphosphonate. Auch hier sind die Rp-konfigurierten Isomere stabiler als die Sp-konfigurierten und stabiler als das unmodifizierte Analogon. Benzylphosphonate werden zudem bereits *in vitro* und *in vivo* gegen das Enten-Hepatitis B Virus (Samstag, 1996) und gegen das Hepatitis C Virus getestet. Auf letzteres wird in Kap. 4 näher eingegangen.

3.4 Interkalation / „*Dangling-End*“-Effekt

Oligonucleotide können mit einer Vielzahl von funktionellen Molekülen an ihrem 3'- oder 5'-Ende oder auch an anderen Stellen des Nucleinsäure-Stranges kovalent verknüpft werden. Generell lässt sich durch 3'- oder 5'-Oligonucleotid-Konjugate die Exonuclease-stabilität erhöhen. Dies ist aber zumeist nur ein attraktiver Nebeneffekt, da die Modifikationen andere Eigenschaften vermitteln sollen. Durch die kovalente Anknüpfung von aromatischen Systemen über einen Linker an die Enden des Oligonucleotid-Stranges kann die Stabilität von Oligonucleotid-Duplexen deutlich erhöht werden. Eine Stabilisierung von 5 bis 10°C pro Modifikation kann erzielt werden, wobei 5'-modifizierte Stränge in der Regel stabiler sind als 3'-modifizierte. Auch ist die Länge des Linkers, der das aromatische Ringsystem mit dem 5'-Ende verbindet, von entscheidender Bedeutung für die Effizienz der Stabilisierung.

Die Stabilisierung kommt über einen sogenannten „*Dangling-End*“-Effekt zustande. Dabei kommt es zu einer starken π - π -Wechselwirkung zwischen der überhängenden funktionellen Gruppe und der letzten Nucleobase des Oligonucleotids. Die ersten Untersuchungen wurden von Hélène mit Acridinderivaten unternommen (Hélène, 1989; Hélène, 1985). Des Weiteren wurden von Kool umfangreiche Studien mit unpolaren Heterocyclen-Analogs als Überhänge durchgeführt (Kool, 1997; Guckian, 1996). Dabei konnte er eine signifikante Erhöhung der Duplexstabilität erzielen. In Abb. 3.6 ist schematisch die Ausbildung eines „*Dangling-End*“-Effektes mit einem überhängenden Nucleosid-Analogon dargestellt.

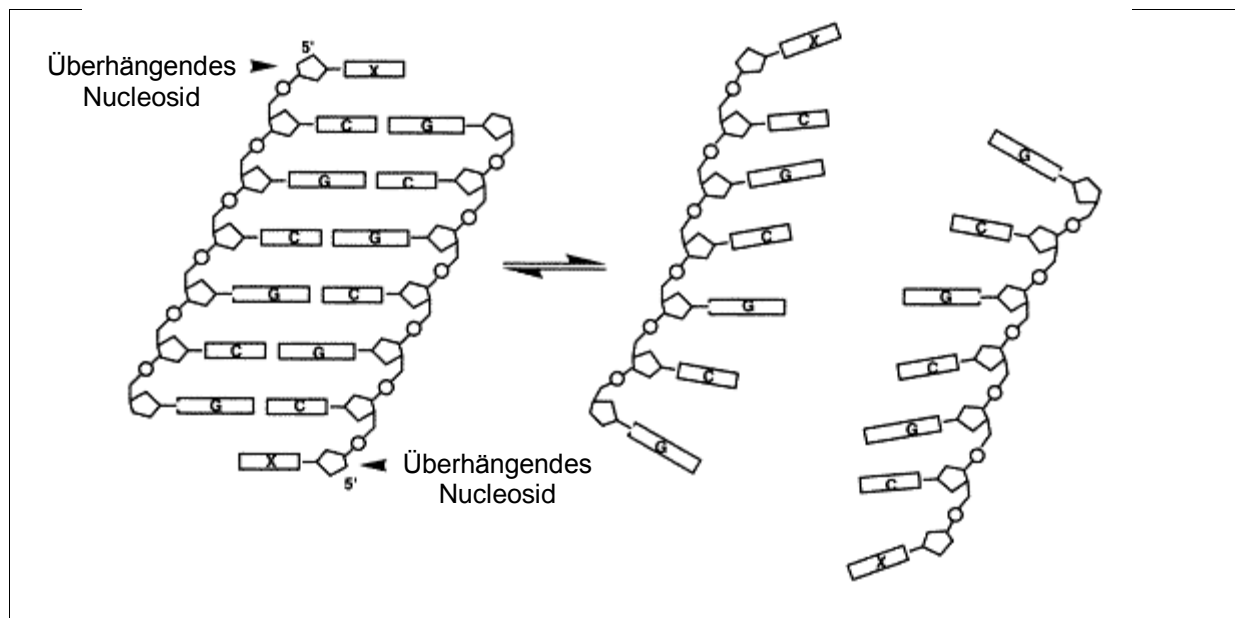


Abb. 3.6 Schematische Darstellung des „Dangling-End-Effektes“ anhand eines selbstkomplementären Hexamer-Duplex mit einem 5′-überhängenden Nucleosid. Es ist der denaturierte und renaturierte Zustand gezeigt.

Auch durch Einführen von Interkalator-Molekülen in der Mitte eines Oligonucleotid-Duplexes konnte eine deutliche Steigerung der Duplexstabilität erreicht werden. Die Anbindung erfolgt ebenfalls über einen Linker der meistens über eine Aminofunktion oder über einen Ester an das Phosphatrückgrat gebunden ist (Asseline, 1997; Asseline, 1996; Privat, 2001). Die Gründe für die Stabilisierung liegen wiederum in der Erhöhung der π - π -Wechselwirkung des Interkalators mit den Nucleobasen oder in der Bindung an das Phosphatrückgrat in der Helixfurche (engl.: *groove binding*). Um die Stärke der Interaktion zwischen dem Oligonucleotid und dem Liganden vorherzusagen, wurden zahlreiche Modelle aufgestellt und *ab initio* Kalkulationen durchgeführt (Friedman, 1992; Hunter, 1990; Hopfinger, 1995).

Aus der Vielzahl der synthetisierten Interkalatoren seien in diesem Zusammenhang Anthracen- (Casale, 1990), Phenazin- (Ossipov, 1998), Pyren- (Puri, 1997; Zamaratski, 1998), Acridin- (Fukui, 1996), und Daunomycinderivate (Dikalov, 1991) erwähnt. Ein Hindernis für die Einsetzbarkeit dieser Verbindungen ist die Säure- bzw. Basenlabilität der sich ausbildenden Phosphoramide bzw. Phosphortriester. Die Anbindung der Interkalator-Linker-Gruppe über eine P-C-Bindung ist eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen.

4 Hepatitis C Virus

4.1 Prävalenz, Übertragung, Genotypen, Therapie

Das Hepatitis C Virus (HCV) gehört zur Gruppe der Flaviviren, der u.a. auch das Gelbfieberevirus zugeschrieben wird. Mit seiner erfolgreichen Klonierung 1989 war die langjährige Suche nach dem Erreger der parenteral übertragenen „Non-A-Non-B“-Hepatitis beendet (Choo, 1989). Weltweit sind schätzungsweise 170 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert. Allein in Europa sind es 4 Millionen. In Deutschland sind ca. 800.000 Bundesbürger betroffen, das entspricht etwa 1% der Bevölkerung (Cohen, 1999). Die Weltkarte (Abb. 4.1) gibt einen Überblick über die HCV-Prävalenz im Jahre 2000. Vom Hepatitis C Virus sind bisher 6 verschiedene Genotypen und circa 30 Subtypen bekannt. Die Genotypen kommen in verschiedenen Regionen der Welt unterschiedlich häufig vor. Die HCV-Genotypen 1 und 2 treten weltweit auf, während der Typ 3 bisher nur in Europa, Nordamerika, Thailand und Indien gefunden wurde. Genotyp 4 wird häufig im Mittleren Osten, die Genotypen 5 und 6 vorwiegend in Südafrika und Hongkong diagnostiziert. In Deutschland findet man vorwiegend die Genotypen 1b (51%) sowie 1a (23%).

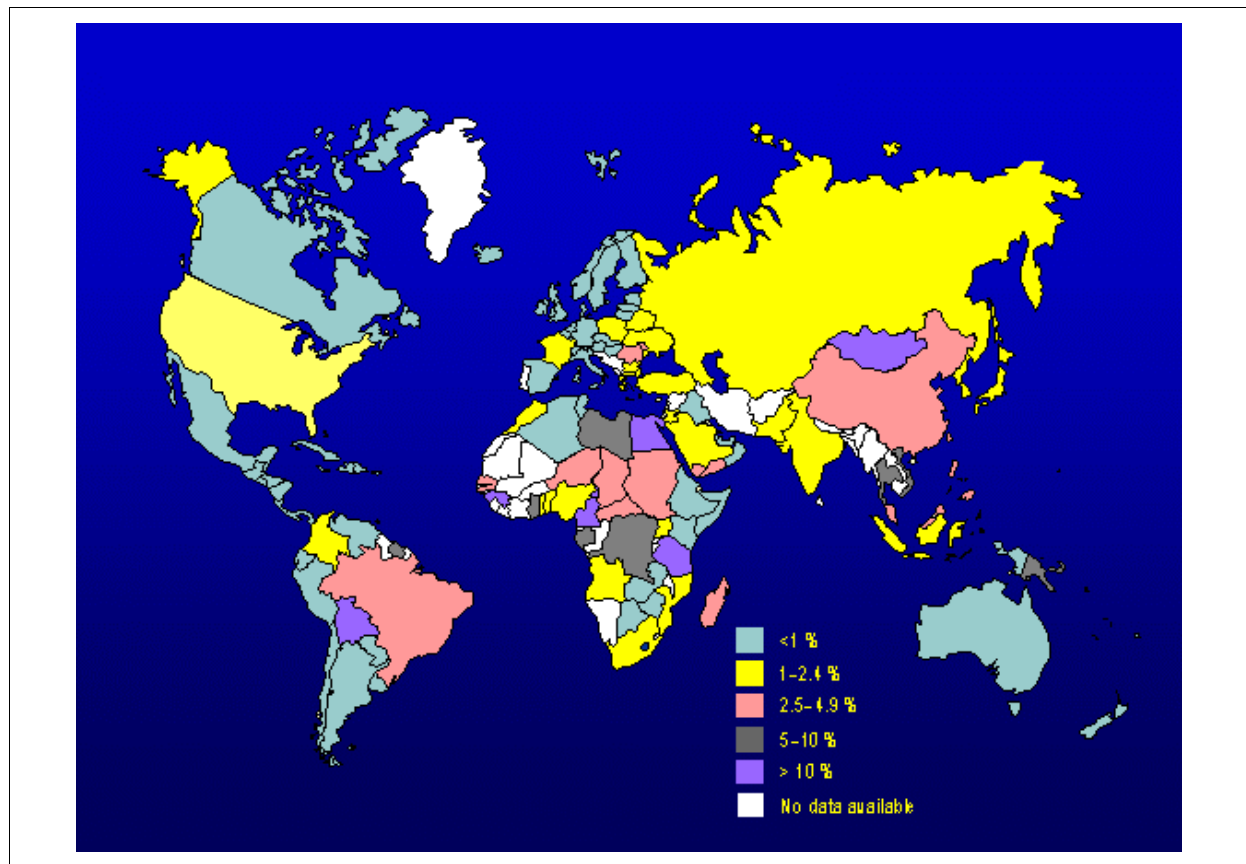


Abb. 4.1 Hepatitis C Virus Prävalenz 2000 (WHO, 2000)

Der Virus wird durch infiziertes Blut übertragen. Da die Gefahr der Übertragung durch Blutkonserven und Plasmaprodukte seit 1990 deutlich verringert werden konnte, spielen heute andere Blutübertragungswege eine wichtige Rolle. Gefährdete Personengruppen sind Zahnärzte, medizinisches Personal, Reinigungspersonal und in größtem Maße Drogenabhängige (Abb. 4.2). Eine Infizierung durch Geschlechtsverkehr ist im Vergleich zum HIV deutlich seltener. Die Gefahr der Übertragung von der Mutter auf ihr Kind ist mit ca. 6% relativ gering (Cohen, 1999; Di Bisceglie, 2000). Der medizinischen Diagnose einer HCV-Infektion dienen serologische Assays sowie der Nachweis von Antikörpern

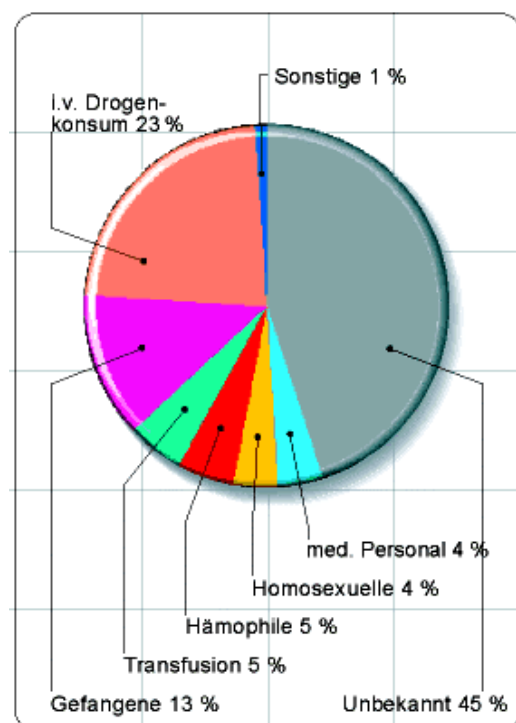


Abb. 4.2 Übertragungswege des HCV in Deutschland

oder viraler HCV-RNA. Für die eindeutige Typisierung des Virus und der damit verbundenen Therapie ist eine Kombination der Methoden erforderlich. Der Krankheitsverlauf nach einer HCV Infektion kann sehr unterschiedlich sein. Die HCV-RNA kann schon recht bald nach einer Infektion detektiert werden. Sechs bis acht Wochen nach der Infektion steigt der Spiegel der Alaninaminotransferase stark an und es kommt in 30% der Fälle zur Gelbsucht (Conry-Cantelina, 1997). Ungefähr 20% der Infizierten eliminieren das Virus nach der Infektion. Bei den verbleibenden 80% kommt es zu einem chronischen Krankheitsverlauf. Bei 20-30% der chronisch Kranken kommt es zu einer Leberzirrhose, die sich bei 5% der chronisch Infizierten innerhalb von 2-6 Jahren zu einem hepatozellulären Karzinom ausweitet.

Eine spezifische Therapie gegen Hepatitis C ist bislang nicht verfügbar. Die medikamentöse Behandlung verläuft zurzeit über eine Kombinationstherapie aus pegyliertem Interferon- α (PEG-INF- α) und Ribavirin (Kashara, 2000). Interferone sind antiviral wirkende Cytokine, die durch eine virale Infektion induziert werden. Bei Ribavirin (1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid) handelt es sich um ein Nucleosid-Analoga das alleine verabreicht keine Wirkung gegen HCV zeigt, obwohl es zahlreiche andere Viren hemmt. Die Standardtherapie erfordert zweimal wöchentlich die subkutane Applikation von 2 bis 4 Millionen Einheiten pegyliertem Interferon- α (abhängig von Genotyp/Subtyp) über sechs bis zwölf Monate (Pockros, 2002; Idéo, 2002). Zusätzlich wird Ribavirin oral verabreicht. Etwa 50% der chronisch HCV-Infizierten sind nach einem halben Jahr virenfrei. Entscheidend für den Erfolg sind Alter, Geschlecht, Alkoholkonsum und der Genotyp. Die größten Erfolgschancen hat eine junge, relativ frisch infizierte Frau mit den Genotypen 2 oder 3. Der in Deutschland häufig anzutreffende Genotyp 1b spricht hingegen sehr schlecht auf die Kombinationstherapie an. Die Behandlung bringt zudem starke Nebenwirkungen mit sich. Unmittelbar nach der Injektion kommt es zu hohem Fieber und die geistige und körperliche Leistungsfähigkeit ist über den Behandlungszeitraum deutlich herabgesetzt. Zudem treten häufig starke Depressionen bei den Patienten auf.

4.2 Struktur des Hepatitis C Virus

Der Hepatitis C Virus gehört zur Gruppe der Flaviviren. Sein Genom besteht aus einzelsträngiger-(+)-Strang RNA mit etwa 9500 Nucleotiden (Abb. 4.3). Die Sequenz enthält einen einzigen offenen Leserahmen (ORF, engl.: *open reading frame*), der sich über das gesamte Genom erstreckt. Der translatierte Polyprotein-Precursor aus 3010 bis 3033 Aminosäuren wird durch zelluläre Proteasen in seine funktionellen Einheiten gespalten. Das HCV Genom lässt sich in Struktur- und Nicht-Strukturproteine unterteilen.

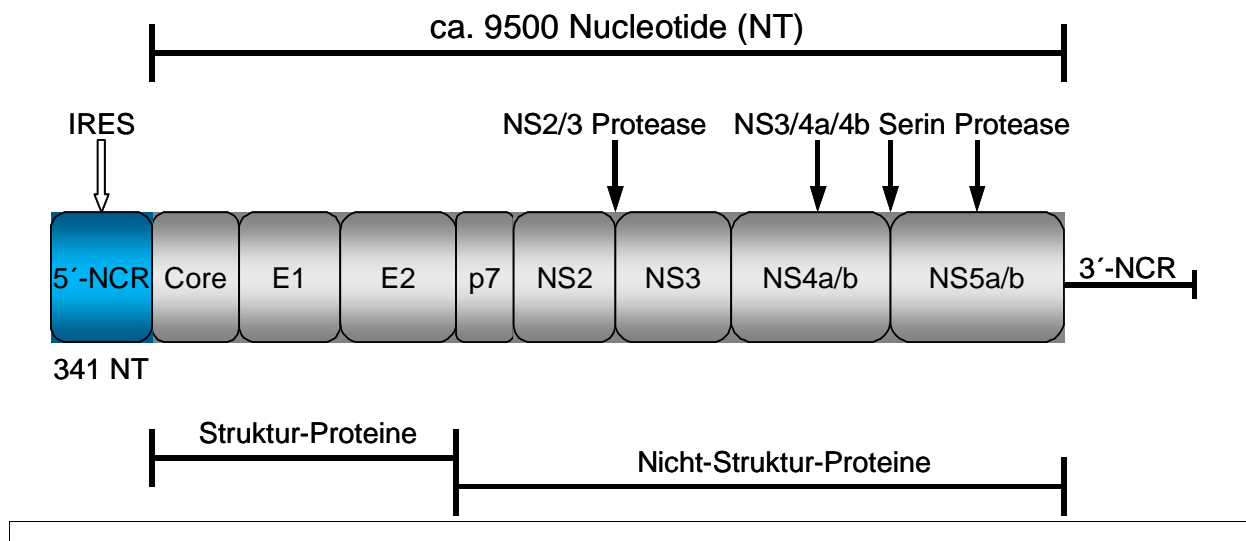


Abb. 4.3 Schematischer Aufbau des RNA-Genoms des Hepatitis C Virus

Im Falle des multifunktionalen Nicht-Struktur-Proteins NS5 handelt es sich um eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die für die Replikation des Genoms zuständig ist (Rosenberg, 2001). Das NS3-Protein übt die Funktion einer Serin-Protease aus und ist für die Spaltung des Protein-Precursors an den Stellen NS2/NS3, NS4a-NS4b, NS4b-NS5a und NS5a-NS5b verantwortlich. Das Core-, das E1- und das NS2-Protein sind die drei strukturgebenden Proteine des HCV, wobei die letzteren stark glykosyliert vorliegen. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich wie am 3'-Ende eine nichtcodierende Region (NCR, engl.: *non coding region*). Die 5'-NCR besitzt eine Länge von 324 bis 341 Nucleotiden, ist hoch konserviert und weist die niedrigste Genomvariabilität auf. Die HCV-Subtypen 1a, 1b und 1c besitzen nahezu identische 5'-NCRs. Die 5'-NCR dient dem Virus als interne, ribosomale Angriffsstelle (IRES, engl.: *internal ribosomal entry site*) für die Synthese des Polyprotein-Precursors (Melcher, 2003; Wang, 1995a; Wang,

Das Sekundärstrukturmodell von Honda diene während dieser Arbeit als Strukturvorlage (Abb. 4.4). Das Modell ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von vier stark gefalteten Domänen (Tuplin, 2002). Die in dieser Arbeit synthetisierten Antisense-Oligonucleotide wurden gegen die Domäne IV, die das Startcodon beinhaltet, gerichtet und werden in Kapitel 10.1 noch genauer besprochen.

4.3 Antisense-Strategien gegen HCV

Es gibt inzwischen zahlreiche Entwicklungsansätze, um den Hepatitis C Virus zu bekämpfen. Die Medikamente befinden sich bereits in klinischen Studien. Dazu gehören alternative Interferone („Albuferon“, „Omega Interferon“), Nucleosidanaloga („Levovirin“, „Viramidine“), IMPDH-Inhibitoren („VX-497“), NS3 Protease- sowie Helicase Inhibitoren, intrazelluläre Antikörper und Ribozyme („Heptazyme“) (McHutchinson, 2002). Aufgrund des hohen Konservierungsgrads und der Funktionalität als IRES bietet die 5'-NCR die optimalen Voraussetzungen die Translation der viralen Proteine mit Antisense-Oligonucleotiden spezifisch zu inhibieren. In vielen bislang veröffentlichten Studien sind die Antisense-Oligonucleotide gegen diese Region oder den Anfang des sich anschließenden Core-Gens gerichtet (siehe Abb 4.3). In einigen Untersuchungen wurden die Antisense-Oligonucleotide auch gegen die NS3-Protease/Helicase-Region gerichtet (Heintges, 2000). Die umfangreichsten Studien wurden bei der Firma ISIS Pharmaceuticals durchgeführt. Die komplette 5'-NCR sowie der Beginn der Core-Region wurde mit 20mer Vollthioaten untersucht, die um je zehn Nucleotide in der Zielsequenz verschoben waren (Hanecak, 1996). Die Regionen mit der effektivsten Inhibierung wurden in Schritten von zwei Nucleotiden wiederum mit 20mer Vollthioaten detaillierter analysiert. Zum Schluss der Untersuchung wurde das geeignetste 20mer noch in der Länge variiert. Zudem wurden die Studien mit 2'-O-methoxyethyl-modifizierten Oligonucleotiden durchgeführt (Brown-Driver, 1999). Die erhaltenen Ergebnisse waren dabei im Bereich der HCV-Sequenz 335 bis 379 mit den voll-modifizierten Phosphorthioaten vergleichbar. Mit der Substanz ISIS 14803 befindet sich bereits ein Antisense-Oligonucleotid in der klinischen Phase II. Die Zielsequenz befindet sich bei den Nucleotiden 330 bis 349 des HCV-Genoms (Witherell, 2001). Es wird ein

20mer Vollthioat eingesetzt, in dem alle Cytidine durch 5-Methylcytidin ersetzt sind. Dies hat zur Folge, dass die Bindungsaffinität erhöht wird und die RNase H Aktivität erhalten bleibt (Zhang, 1999).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Caselmann (früher Klinikum Großhadern, heute Universitätsklinikum Bonn) gelang es ein weiteres potentes Antisense-Oligonucleotid gegen Hepatitis C Virus-RNA zu entwickeln. Das ursprünglich gefundene 23mer Vollthioat, dass gegen die Nucleotide 326 bis 348 des HCV-Genoms gerichtet war, konnte in weiterführenden Untersuchungen optimiert werden (Alt, 1995). Es wurden sehr effektiv wirkende, terminal modifizierte 17mer Oligonucleotide gefunden. Dabei wurden am 3'- und 5'-Ende je drei Phosphordiesterbindungen als Phosphor-thioate, Methyl- oder Benzylphosphonate modifiziert (Lehmann, 2001; Caselmann, 2000; Alt, 1999; Caselmann, 1997; Eisenhardt, 1996). Mit dieser Strategie konnte die Lipophilie der Antisense-Oligonucleotide erhöht und die RNase H Aktivität aufgrund der Abfolge von 11 natürlichen Phosphordiester-Bindungen erhalten werden. Auch wurden an die modifizierten 17mer Oligonucleotide Gallensäuren gekuppelt, um die Zellaufnahme in Leberzellen zu erhöhen (Lehmann, 2001b; Lehmann, 2001c). Eine genauere Betrachtung der bereits erzielten Resultate ist in Kap. 10.1 wiedergegeben.

5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es neue, lipophile, arylalkylmodifizierte Oligonucleotide zu synthetisieren, die Auswirkung der absoluten Konfiguration der Modifikationen in Doppelsträngen zu untersuchen und ihre Anwendbarkeit als Antisense-Oligonucleotide gegen den Hepatitis C Virus zu testen. Aufbauend auf Arbeiten zur Synthese von Benzyl-Rückgrat modifizierten Oligonucleotiden sollten lipophilere, sterisch anspruchsvollere Modifikationen eingeführt werden. Die Benzylphosphonate zeigten im Rahmen früherer Arbeiten sehr interessante, positive Eigenschaften hinsichtlich ihres stabilisierenden Einflusses auf DNA-Duplexe. Dieser Effekt hängt sehr stark von der absoluten Konfiguration der Modifikation am Phosphatrückgrat ab (Abb. 5.1). Durch die gezielten Veränderungen des Phosphatrückgrates – ausgehend von der Benzylmodifikation – sollte die neue Substanzklasse der Arylalkyl-Rückgrat modifizierten Oligonucleotide systematisch untersucht werden.

Als erstes sollte getestet werden inwiefern eine Verlängerung der Alkylkettenlänge die Eigenschaften der resultierenden Oligonucleotide beeinflusst. Ferner sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Größe des aromatischen Systems (Phenyl, Naphthyl, Anthracenyl) und heteroatomare Aromaten (Acridin, Phenazin) ausüben. Zudem sollten

Rückgratmodifikationen synthetisiert werden, deren Ringsystem durch funktionelle Gruppen (Alkyl, Halogen, Methoxy) substituiert ist.

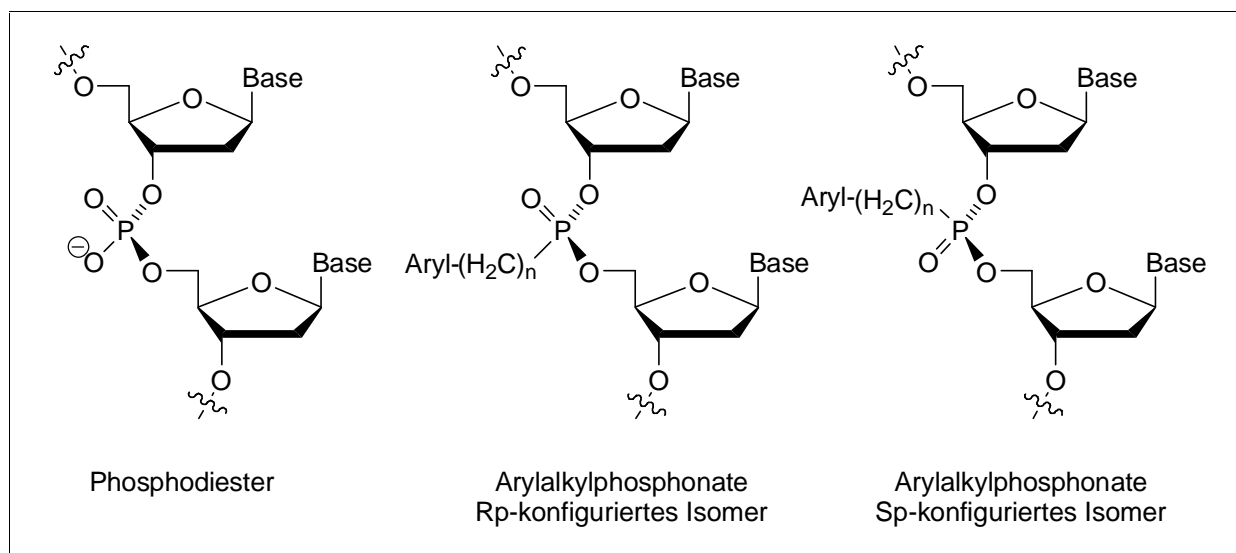


Abb. 5.1 Allgemeine Darstellung von Arylalkyl-Rückgrat modifizierten Oligonucleotiden

Die Darstellung der rückgratmodifizierten Oligonucleotide sollte mittels der Oligonucleotid-Festphasensynthese erfolgen. Aus diesem Grund sollten entsprechend modifizierte, kupplungsfähige Phosphoramidite dargestellt werden (Abb. 5.2).

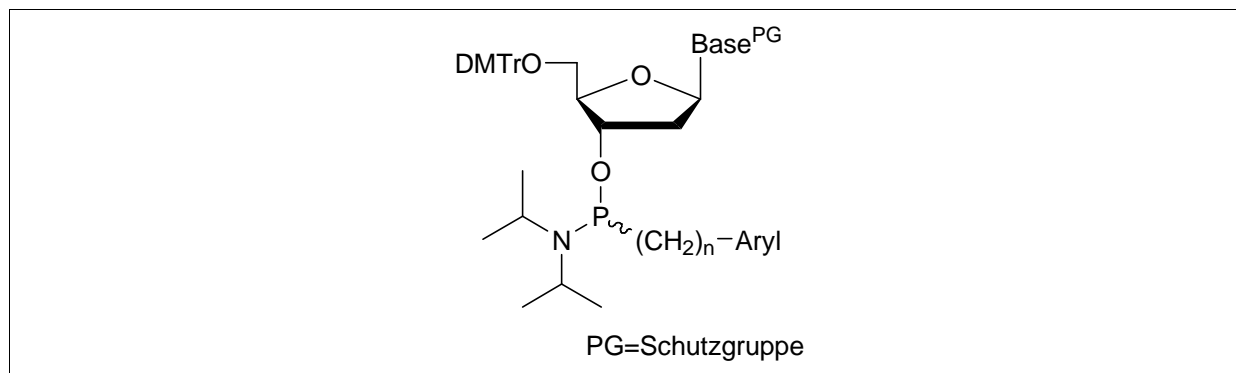


Abb. 5.2 Modifiziertes Phosphoramidit für die Oligonucleotid-Festphasensynthese

Diese modifizierten Phosphoramidite sollten daraufhin in Modell-Oligonucleotide eingebaut werden. Um den Einfluss der eingeführten Gruppen auf die Oligonucleotid-Duplexe zu untersuchen, sollten zu Beginn einfach modifizierte Stränge dargestellt werden. Nach erfolgter Synthese und Aufreinigung der Oligonucleotide sollten die entstandenen Diastereoisomere mittels RP-HPLC getrennt werden.

Die durch die Modifikationen hervorgerufene Veränderung der Lipophilie der Oligonucleotide sollte mittels RP-HPLC untersucht werden.

Nach Hybridisierung mit dem unmodifizierten Gegenstrang sollte von den diastereoisomerenreinen Duplexen die Schmelztemperatur (T_m -Wert) ermittelt werden. Ferner war das Ziel durch CD-Untersuchungen den Einfluss der Modifikationen auf die Struktur der Doppelhelix zu untersuchen. Falls möglich sollten auch Fluoreszenz-Messungen durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die eindeutige Bestimmung der absoluten Konfiguration der Rückgratmodifikation. Zu diesem Zweck sollten diastereoisomerenreine arylalkylmodifizierte Dimere synthetisiert werden. Durch 2D-ROESY-NMR-Untersuchungen sollte versucht werden - analog zu den Methylphosphonaten - die Konfiguration zu bestimmen.

Parallel zu diesen Studien sollte getestet werden inwieweit die synthetisierten Modifikationen sich für den Antisense-Einsatz zur Inhibierung der Hepatitis C Virus Genexpression eignen. Die Durchführung dieses Projekts erfolgt in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Caselmann an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität in Bonn. Hier werden sämtliche erforderlichen biologischen zellfreien *in vitro* und Zellkultur *in vitro*-Assays durchgeführt. Die bisherige Zusammenarbeit führte zu terminal methyl- und benzylmodifizierten 17mer Antisense-Oligonucleotiden, die die Expression des Hepatitis C Virus Genoms *in vitro* effizient inhibieren. Um die Wahrscheinlichkeit eines trägervermittelten Oligonucleotid-Transports durch die Zellmembran zu verbessern, sollten die lipophileren Modifikationen in das 17mer Oligonucleotid [5'-d(T•G•G•TGCACGGTCTA•C•G•A); •=Modifikationsstelle] eingebaut werden. Die synthetisierten Antisense-Oligonucleotide sollten danach hinsichtlich ihrer Lipophilie, Nucleasestabilität, Aktivierung der RNase H, der Hybridisierung (T_m -Wert) zum sense-DNA- bzw. RNA-Strang untersucht werden. Zudem sollten zellfreie *in vitro* und Zellkultur *in vitro*-Untersuchungen zur Inhibierung der HCV-Genexpression durchgeführt werden.

6

Chemische Synthesen

6.1 Auswahl der Modifikationen

Als Grundlage für die Wahl der Modifikationen dienen die Eigenschaften von Benzyl- und Methyl-Rückgrat modifizierten Oligonucleotiden (siehe Kap. 3.3). Bei diesen Modifikationen ist das negativ geladene Sauerstoffatom des Phosphatrückgrates durch eine lipophile, ungeladene Gruppe substituiert. Benzyl, als einfachster Vertreter der Arylalkyl-Verbindungsklasse, zeigte dabei im Vergleich zu methylmodifizierten Oligonucleotiden signifikante Unterschiede. Benzylmodifizierte Oligonucleotide zeigen höhere T_m -Werte mit den komplementären DNA- oder RNA-Strängen, sind stabiler im basischen Milieu und erwiesen sich als äußerst potente Modifikationen für Antisense-Oligonucleotide (siehe Kap. 4.3 und 10.1). Ferner sind Benzylmodifikationen mit ihrer P-C-Bindung deutlich stabiler gegenüber Säuren als Phosphoramide mit einer P-N-Bindung (Froehler, 1986). Lipophile, ungeladene Phosphatrückgrate können ebenfalls mittels Triestern (P-O-Bindung) erhalten werden (Marcus-Sekura, 1987). Da diese jedoch unter basischen Bedingungen relativ instabil sind und des weiteren als potentielle Alkylierungsreagenzien fungieren sind sie für den Antisense-Einsatz ungeeignet.

Ziel dieser Arbeit war es lipophile, arylalkylmodifizierte Oligonucleotide zu synthetisieren, die Auswirkung der absoluten Konfiguration der Modifikationen zu untersuchen und ihre Anwendbarkeit als Antisense-Oligonucleotide gegen den Hepatitis C Virus zu testen. Aus diesem Grund wurden zuerst die Phenylalkylmodifikationen **M1** ausgewählt (Abb. 6.1). Durch die Variation der Alkylkettenlänge sollte der ideale Abstand des aromatischen Systems vom Phosphatrückgrat ermittelt werden. Die Verbindungsklasse **M2** (p-substituierte Benzylmodifikationen) wurde gewählt um den Einfluss von Substituenten auf benzylmodifizierte Oligonucleotide zu untersuchen. Außerdem sollte somit die Variabilität der gewählten Synthesestrategie getestet werden (vgl. Kap. 6.2). Das 2,4-Difluorphenyl-Ringsystem **M3** wurde im Arbeitskreis als Nucleobasen-Analogon synthetisiert. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der Basenstapelungswechselwirkungen in Oligonucleotiden erzielt werden (Parsch, 2002; Parsch, 2000). Die Synthese der 2,4-Difluorbenzylphosphonate sollte zeigen inwieweit sich die dabei ermittelten Ergebnisse auf das Phosphatrückgrat übertragen lassen.

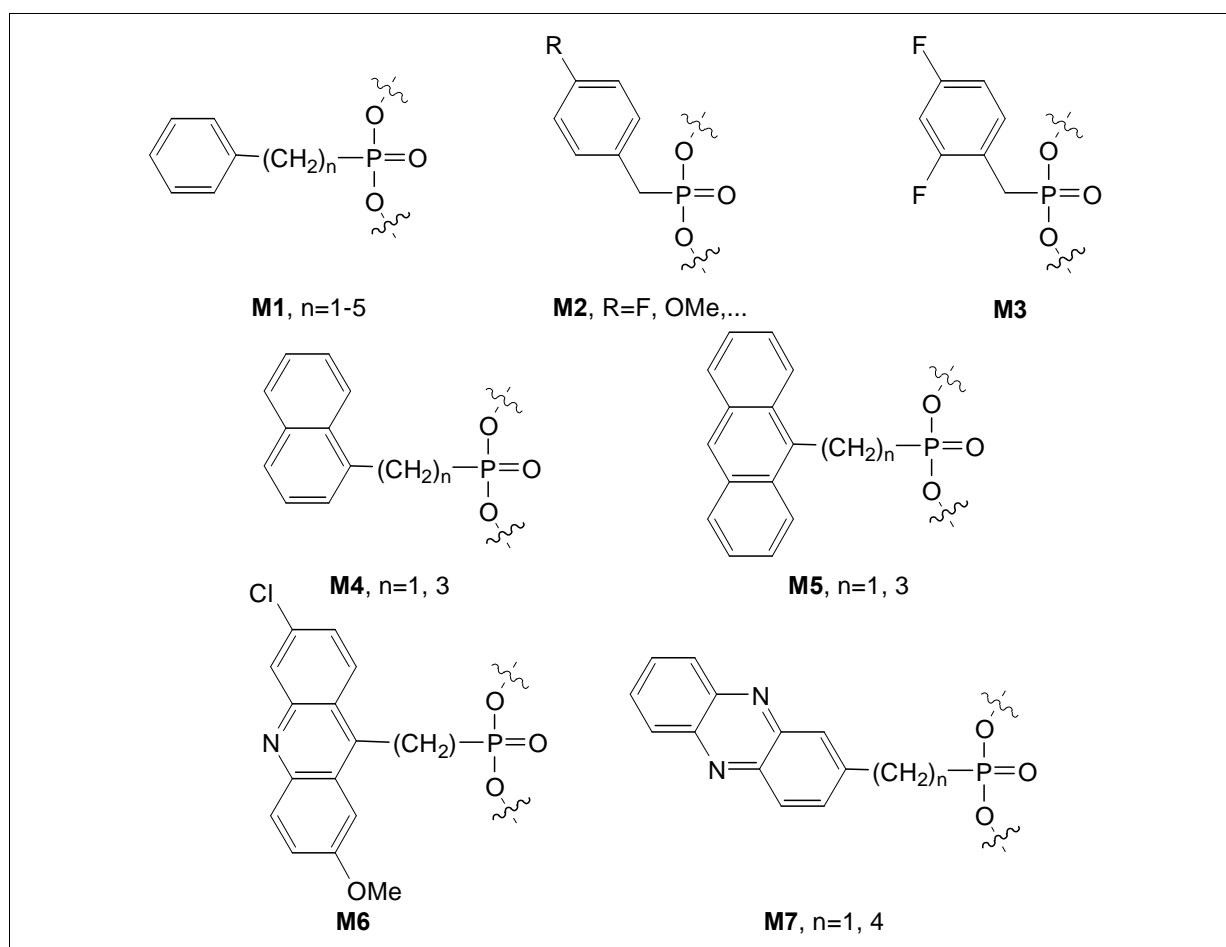


Abb. 6.1 Ausgewählte Modifikationstypen (**M1-M7**)

Nach der Optimierung der Alkylkettenlänge sollten unterschiedliche aromatische Systeme getestet werden. Die Wahl fiel dabei auf die Naphthyl- und Anthracenylmodifikationen **M4**, **M5**. Das Anthracenringsystem wurde bereits unter anderem für die Modifikation der 2'-OH Gruppe in Ribonucleinsäuren eingesetzt. Dabei konnte eine deutliche Stabilisierung von Duplexen erzielt werden (Yamana, 1995). Von Interesse für die therapeutische Anwendung sind ferner heteroaromatische Ringsysteme, die bereits über diverse Linker an das 5'-Ende beziehungsweise 3'-Ende von Oligonucleotiden gekuppelt wurden (Kap. 3.4). Aus diesem Grund sollten die Acridinderivate **M6** sowie die Phenazinderivate **M7** synthetisiert werden. Beide Ringsysteme sind zudem als exzellente Interkalatoren bekannt. Mit der Modifikation des 3'- bzw. 5'-Endes eines Oligonucleotides durch Acridinderivate konnte die thermische Stabilität der entsprechenden Oligonucleotid-Duplexe signifikant erhöht werden (Hélène, 1984; Silver, 1997; Fukui, 1996). Die Wahl der Linker-Kettenlänge spielte auch für die Stabilisierung der Oligonucleotid-Duplexe eine entscheidende Rolle (Asseline, 1996).

6.2 Synthesestrategie

Die Darstellung der modifizierten Oligonucleotide sollte über die Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode erfolgen. Für die Synthesestrategie der zu synthetisierenden arylalkylmodifizierten Phosphoramidite wurde der Syntheseweg der benzylmodifizierten Bausteine zu Grunde gelegt. Die Vorgehensweise wurde von Samstag und Lehmann entwickelt und optimiert (Samstag, 1992; Samstag, 1994; Lehmann, 2001). Die schematische Darstellung der benzylmodifizierten Phosphoramidite ist in Abbildung 6.2 wiedergegeben.

Die Synthese verläuft dabei über das modifizierte, reaktive, dreiwertige Phosphorylierungsreagenz **5**. Ausgangspunkt für dessen Darstellung ist Benzylchlorid **1**, dass mit Magnesium zu dem entsprechenden Grignard-Reagenz umgesetzt wird. Das Benzylmagnesiumchlorid **2** wird umgehend mit wasserfreiem ZnCl_2 in die unreaktivere zinkorganische Verbindung **3** ummetalliert. Die Reaktion des Intermediates **3** mit Phosphortrichlorid führt zu Benzyldichlorphosphan **4**. Das Phosphorylierungsreagenz Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **5** erhält man durch Umsetzung des

synthetisierten Dichlorphosphans **4** mit *N,N*-Diisopropylamin. Das benzylmodifizierte Phosphorylierungsreagenz **5** kann mit den geschützten Nucleosiden zu den entsprechenden Phosphoramiditen **6** umgesetzt werden. Diese Verbindungen können in der Oligonucleotid-Festphasensynthese eingesetzt werden.

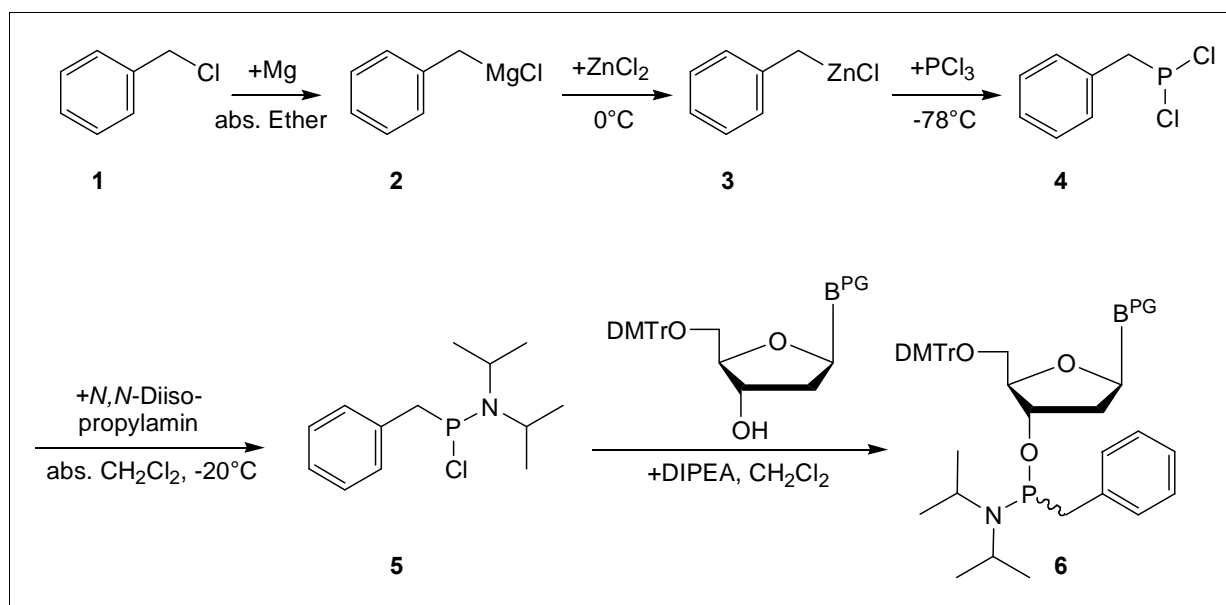


Abb. 6.2 Synthese benzylmodifizierter Phosphoramidite

Für die Synthese der arylalkylmodifizierten Phosphoramidite musste dieser Reaktionsweg auf einigen Stufen teilweise deutlich modifiziert werden. Veränderungen wurden je nach Modifikation bei der Wahl des Halogens der Ausgangsverbindung, der Art der Ummetallierung, Aufarbeitung und Reaktionsführung vorgenommen.

6.3 Synthese der modifizierten Phosphoramidite

6.3.1 Synthese der Arylalkylhalogenide

4-Phenylbutyl- (12), 5-Phenylpentyl- (13) und 4-(4-Fluorphenyl)butylbromid (17)

Für die Synthese der längerkettigen Phenylalkylhalogenide wurde ein Kettenverlängerungsverfahren mittels Oxetan eingesetzt (Searles, 1951).

Ausgangspunkt für die Reaktion waren Benzylchlorid **1**, 2-Phenylethylbromid **7** und 4-Fluorbenzylbromid **8** (Abb. 6.3). Diese Verbindungen wurden jeweils einer Grignard-Reaktion unterworfen. Hierzu wurden Magnesiumspäne in trockenem Diethylether mit einem geringen Überschuss der Substanzen **1**, **7** und **8** umgesetzt. Zu den erhaltenen Grignard-Lösungen **9-11** wurde in äquimolarer Menge Oxetan (Trimethylenoxid) gegeben und 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach dieser Zeit wurde mit Benzol versetzt und weitere 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Eine Abdestillation des Ethers nach Zugabe des Benzols wurde im Gegensatz zur Vorschrift von Searles nicht durchgeführt. Nach dem Abkühlen wurden die Reaktionsansätze mit ges. NH_4Cl -Lösung hydrolysiert. Die synthetisierten Substanzen **12-14** konnten durch Vakuumdestillation gereinigt werden.

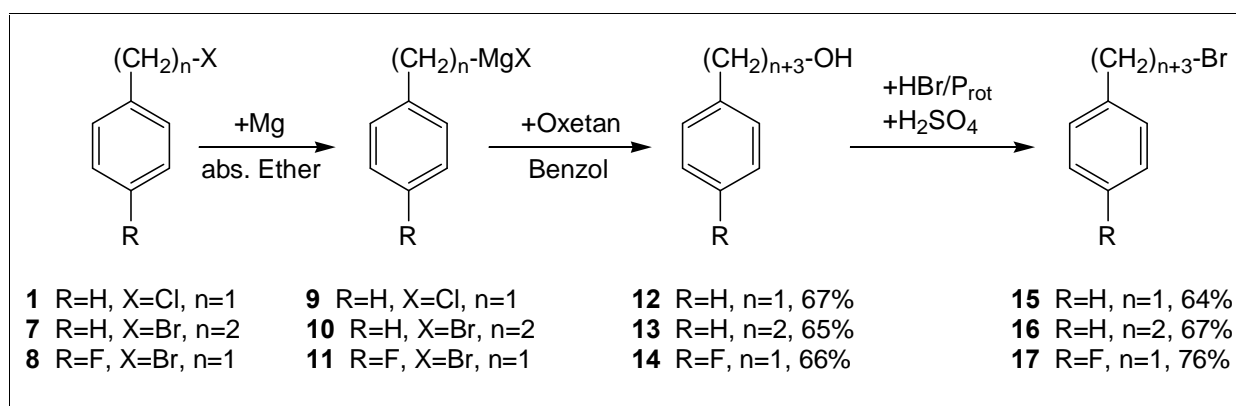


Abb. 6.3 Synthese von 4-Phenylbutylbromid **15**, 5-Phenylpentylbromid **16** und 4-(4-Fluorphenyl)butylbromid **17**.

Die erhaltenen Alkohole **12-14** wurden im nächsten Schritt mittels einer Substitutionsreaktion in die Halogenverbindungen überführt (Oae, 1953; Huisgen, 1954). Aus Reaktivitätsgründen wurden für den weiteren Syntheseweg die bei der Umsetzung mit Magnesium reaktiveren Bromide den Chloriden vorgezogen. Dazu wurden die Verbindungen **12-14** in einer Standardreaktion mit 48%iger HBr-Lösung und rotem Phosphor versetzt. Nach sechsständigem Kochen unter Rückfluss wurde mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt und weitere 6 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach der Aufarbeitung konnten die Verbindungen mittels Vakuumdestillation gereinigt werden. 4-Phenylbutylbromid **15** wurde in 64%iger, 5-Phenylpentylbromid **16** in 67%iger und 4-(4-Fluorphenyl)butylbromid **17** in 76%iger Ausbeute erhalten.

1-(3-Brompropyl)naphthalen 20 und 3-(2-Naphthoxy)propylbromid 22

Die Darstellung von 3-(1-Naphthyl)propanol **19**, ausgehend von 1-Bromnaphthalen **18**, verlief in Analogie zu den Synthesen der Verbindungen **12-14** (Abb. 6.4). Die im Vergleich geringe Ausbeute von 49% ist auf den Reaktionsschritt von 1-Naphthylmagnesiumbromid mit Oxetan zurückzuführen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Zugabe an Oxetan (0,7-3 äq.), die Reaktionstemperatur wie auch die Reaktionszeit (2-24 Std.) variiert. Nach dreistündigem Erhitzen unter Rückfluss kam die Reaktion jeweils zum Stillstand, wobei die Ausbeute immer unter 50% lag. Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde die Verbindung **19** als viskoses, gelbes Öl erhalten.

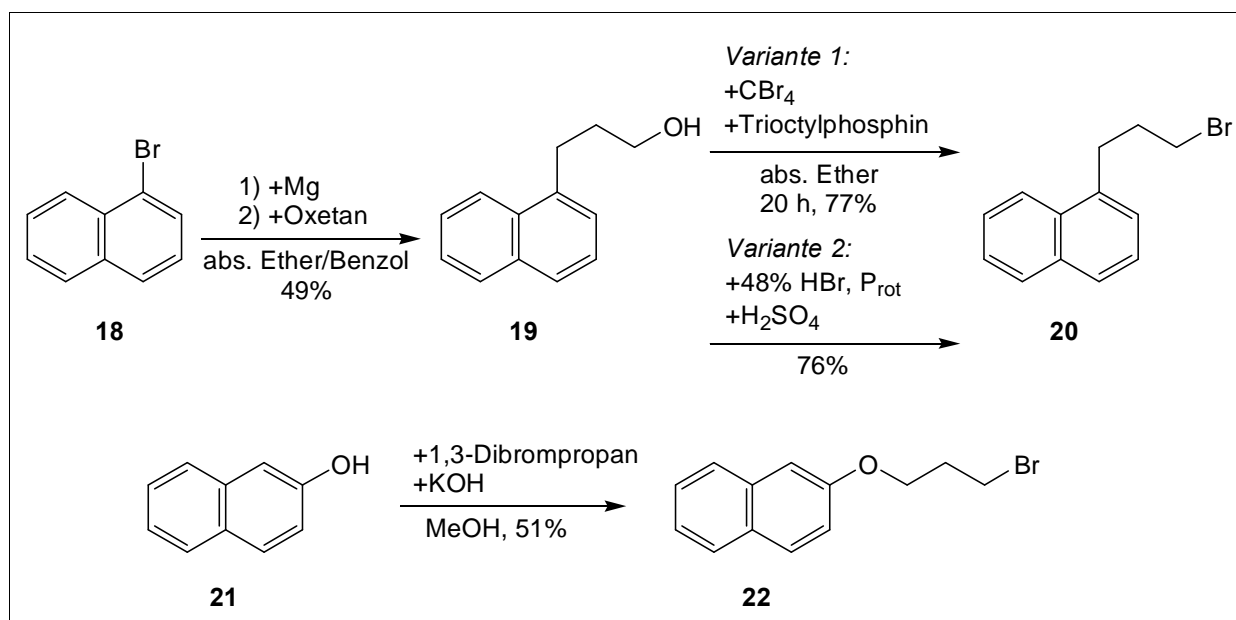


Abb. 6.4 Syntheschema von 1-(3-Brompropyl)naphthalen **20** und 3-(2-Naphthoxy)-propylbromid **22**

Als Hauptnebenprodukt konnte 1-Naphthol isoliert werden. Für die Bromierung des Alkohols wurden zwei Syntheseverarianten getestet. Bei Variante 1 wurde 3-(1-Naphthyl)propanol **19** und CBr₄ in absolutem Ether gelöst und bei 0°C mit Trioctylphosphin versetzt. Die Reaktion war nach 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur beendet. Nach Aufarbeitung und anschließender Säulenchromatographie wurde Verbindung **20** in 77%iger Ausbeute erhalten. Bei der 2. Variante wurde mittels 48%iger HBr-Lösung, P_{rot} und H₂SO₄ bromiert. Die erhaltene Ausbeute von 76% war nahezu identisch mit der zuvor beschriebenen Reaktion.

Als weitere Ausgangsverbindung für modifizierte Phosphoramidite wurde 3-(2-Naphthoxy)propylbromid **22** synthetisiert. Mit dieser Verbindung sollte die Stabilität von aromatisch-aliphatischen Ethern gegenüber der sich anschließenden PCl_3 -Chemie getestet werden. Die Synthese erfolgte nach einer Vorschrift von Tada (Tada, 1990). 2-Naphthol wurde dabei in Methanol gelöst und mit KOH und 3 äq. 1,3-Dibrompropan versetzt. Die Reaktion war nach 36-stündigem Rühren bei RT beendet. Die Verbindung **22** konnte mit einer Ausbeute von 51% nach Säulenchromatographie erhalten werden.

9-(Brommethyl)anthracen **28** und 9-(3-Brompropyl)anthracen **26**

9-(Brommethyl)anthracen **28** konnte durch die Bromierung von 9-Methylantracen **27** mittels *N*-Bromsuccinimid (NBS) dargestellt werden (Thung, 1998). Die Verbindung **27** wurde dabei in CCl_4 gelöst, mit NBS versetzt und 24 Stunden unter Rückfluss gekocht. Das Produkt **28** wurde nach Umkristallisation aus Chloroform/Petrolether (1:1) in Form von gelben Nadeln erhalten (Abb. 6.5).

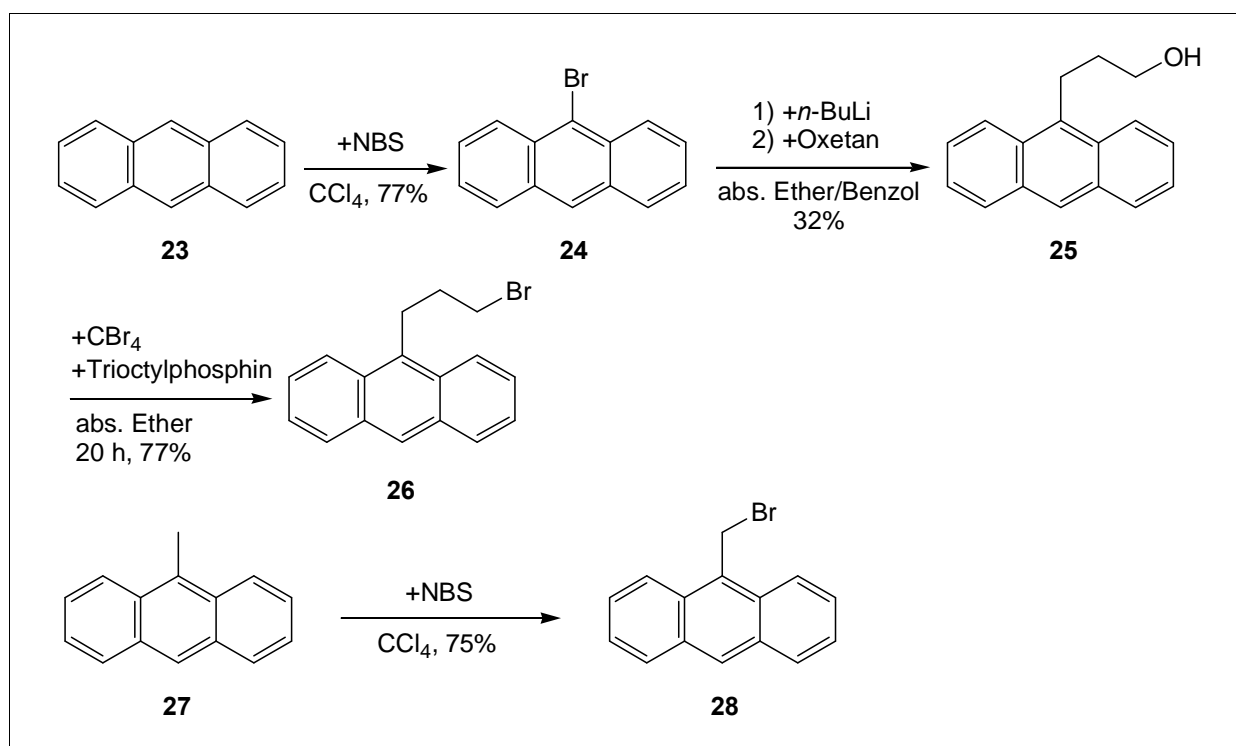


Abb. 6.5 Synthese von 9-(Brommethyl)- **28** und 9-(3-Brompropyl)anthracen **26**

Die Propylseitenkette von 9-(3-Brompropyl)anthracen **26** wurde ebenfalls nach der Methode von Searles eingeführt (Searles, 1951). Als Ausgangsverbindung diente 9-Bromantracen **24** welches durch Bromierung von Anthracen **23** mit NBS in guter Ausbeute dargestellt werden konnte. Da sich 9-Bromantracen **24** nur schlecht in 9-

Magnesiumbromanthracen umsetzen lies, wurde mit der entsprechenden lithiumorganischen Verbindung gearbeitet. Dazu wurde die Verbindung **24** in trockenem Ether gelöst und bei -78°C mit *n*-BuLi versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde innerhalb einer Stunde auf 0°C erwärmt, mit Oxetan versetzt und anschließend mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach Aufarbeitung und Säulenchromatographie konnte 9-(3-Hydroxypropyl)anthracen **25** als gelber Feststoff erhalten werden. Die Bromierung wurde mittels CCl_4 und Trioctylphosphin durchgeführt. 9-(3-Brompropyl)anthracen **26** konnte in guter Ausbeute als gelber Feststoff erhalten werden.

Heteroaromatische Ausgangsverbindungen

Als heteroaromatische Ausgangsverbindungen sollten 2-(Brommethyl)phenazin **32**, 2-(4-Brombutyl)phenazin **34** (Abb. 6.6a), 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** (Abb. 6.6b) und 8-(Brommethyl)chinolin **39** (Abb. 6.6c) dargestellt werden.

Das Phenazin-Grundgerüst wurde mittels einer Ringschlussreaktion synthetisiert (Teuber, 1955). Im ersten Schritt wurde 4-Methylcatechol **29** durch Zugabe von Natriumperodat zum entsprechenden Chinon **30** oxidiert. Für den folgenden Kondensationsschritt wurde dieses zu 1,2-Diaminobenzol gegeben und mit konzentrierter Essigsäure versetzt (Abb. 6.6a). Nach mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluss, Aufreinigung über eine Alumina-Säule und Chromatographie an Kieselgel konnte 2-Methylphenazin **31** erhalten werden. Die Bromierung der Methylgruppe erfolgte unter Standardbedingungen mittels *N*-Bromsuccinimid und dem Radikalstarter α, α' -Azoisobutyronitril (AIBN) mit einer Ausbeute von 86% (Maidwell, 2000). Für die Verlängerung der Seitenkette von 2-(Brommethyl)phenazin **32** wurde wiederum das von Searles etablierte Verfahren gewählt (Searles, 1951). 2-(4-Hydroxybutyl)phenazin **33** konnte dabei jedoch nur in einer Ausbeute von 23% erhalten werden. Die Verbindung zeigte eine hohe Hitzeempfindlichkeit, was die geringe Ausbeute erklärt. Die Effizienz der Reaktion lies sich nicht steigern, da für die Anknüpfung von Oxetan an die Seitenkette Wärmezufuhr vonnöten ist. Die anschließende Bromierung zu 2-(4-Brombutyl)phenazin **34** mittels 48%iger HBr-Lösung, P_{rot} und Schwefelsäure gelang nicht. Ursache hierfür dürfte ebenfalls die thermische Labilität von 2-(4-Hydroxybutyl)phenazin **33** sein. Auch die bei Raumtemperatur durchgeführte Bromierung mittels CBr_4 und Trioctylphosphin führte nicht zu der gewünschten Verbindung. Als Ausgangssubstanz für die Synthese von 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** wurde das kommerziell erhältliche 6,9-Dichlor-2-methoxyacridin **35** gewählt (Abb. 6.6b).

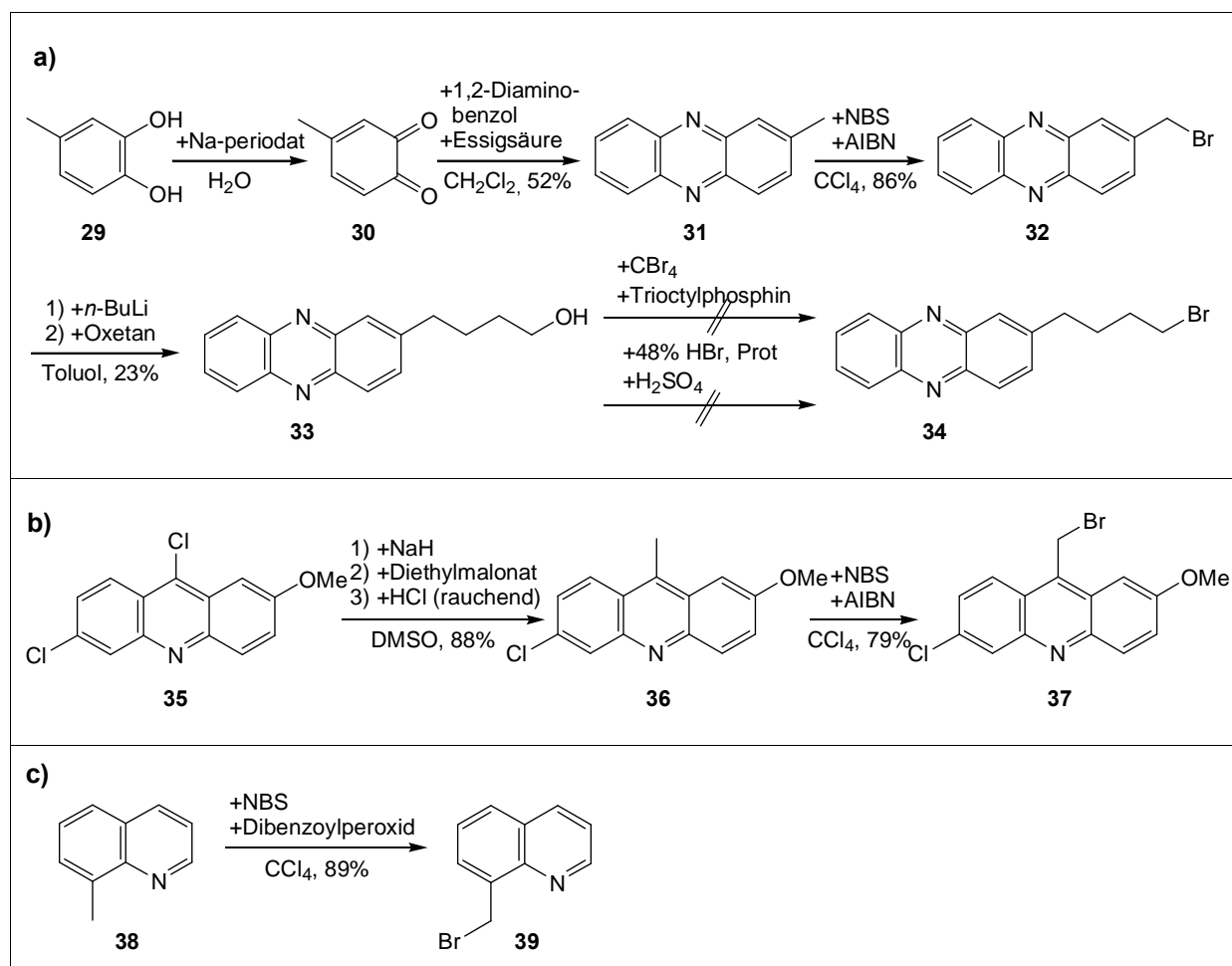


Abb. 6.6 Synthese der heteroaromatischen Ausgangsverbindungen a) 2-(Brommethyl)-phenazin **32** und 2-(4-Brombutyl)phenazin **34** b) 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** c) 8-(Brommethyl)chinolin **39**

Für die selektive Substitution des Chlors in Position 9 des Acridinringes durch einen Methylrest wurde eine Vorschrift von Kurz herangezogen (Kurz, 1998). Dazu wurde das CH-acide Diethylmalonat mittels NaH in das Carbanion überführt und mit 6,9-Dichlor-2-methoxyacridin **35** versetzt. Das dabei intermediär gebildete 6-Chlor-2-methoxy-9-diethylmalonatacridin wurde durch Zugabe von rauchender Salzsäure hydrolysiert. Nach Neutralisation und Aufreinigung wurde 6-Chlor-2-methoxy-9-methylacridin **36** in 88%iger Ausbeute erhalten. Die darauffolgende Umsetzung mit NBS in Gegenwart von AIBN führte zu 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37**.

Die letzte zu synthetisierende heteroaromatische Verbindung, 8-(Brommethyl)chinolin **39**, konnte in einer Einstufenreaktion gewonnen werden (Dalley, 2001). Ausgangsverbindung hierfür war 8-Methylchinolin **38**, das mittels *N*-Bromsuccinimid leicht in die Zielverbindung **39** umgesetzt werden konnte (Abb. 6.6c).

6.3.2 Synthese der (Arylalkyl)dichlorphosphane

Phenylalkyldichlorphosphane **4**, **50-53**

Als Ausgangsverbindungen für die Phenylalkyldichlorphosphane **4**, **50-53** dienten die Phenylalkylhalogenide **1**, **15**, **16**, **40** und **41**. Diese wurden mit Magnesiumspänen zu den entsprechenden magnesiumorganischen Verbindungen umgesetzt (Abb. 6.7). Als Lösungsmittel fungierte dabei absoluter Diethylether. Durch die Verlängerung der Seitenkette nimmt die Reaktivität der Phenylalkylhalogenide ab, so dass ab einer Kettenlänge von $n=2$ die im Vergleich zu den Phenylalkylchloriden reaktiveren -bromide eingesetzt wurden. Die erhaltenen Grignard-Reagenzien **2**, **10**, **42-44** wurden im Anschluss direkt zu den weniger reaktiven cadmiumorganischen Verbindungen **45-49** ummetalliert.

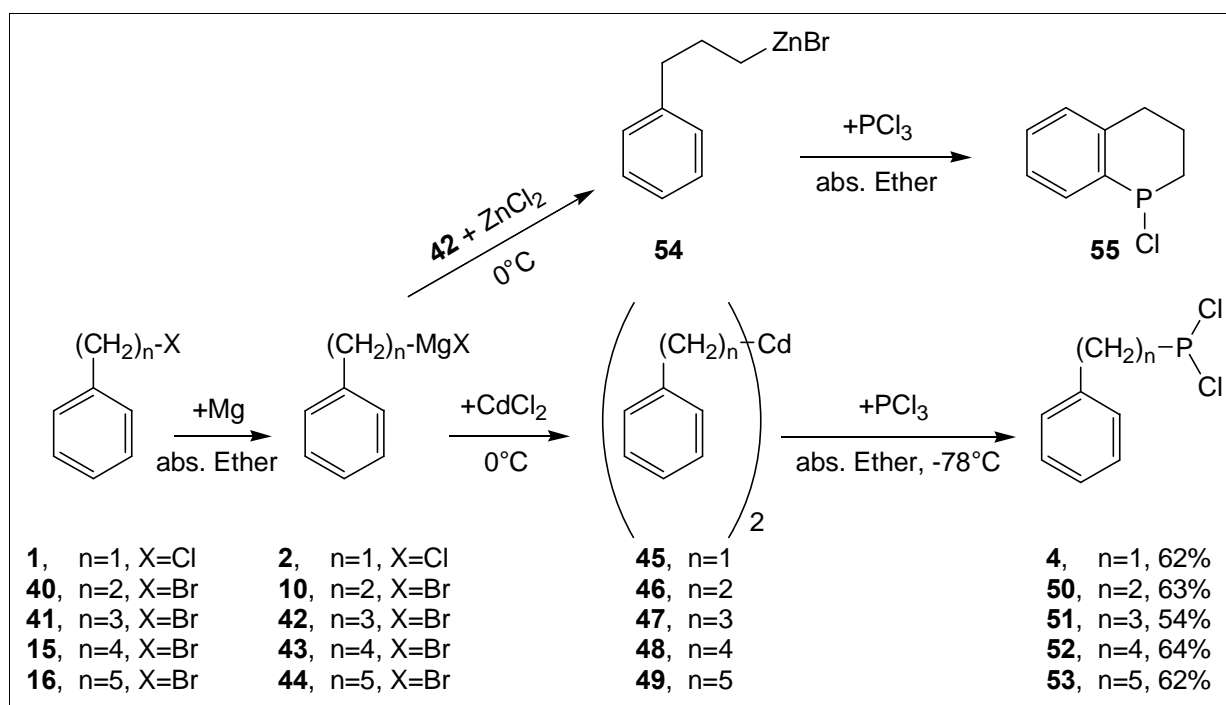


Abb. 6.7 Synthese der Phenylalkyldichlorphosphane **4**, **50-53**

Von dem Einsatz der zinkorganischen Verbindungen (siehe Synthesestrategie Kapitel 6.2) wurde abgesehen, da diese eine unerwünschte Cyclisierungsreaktion bei Verbindungen mit einer Alkylkettenlänge von $n=2$ und $n=3$ zeigten. In Abbildung 6.7 ist diese für die Kettenlänge $n=3$ dargestellt. 1-Chlor-1,2,3,4-tetrahydrophosphinolin **55** wurde während des Erhitzens im Rahmen der fraktionierten Vakuumdestillation von 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51** in Gegenwart von katalytischen Mengen Zn^{2+} gebildet.

In Anwesenheit von Cd^{2+} -Ionen wurde diese Reaktion nicht beobachtet (Rowley, 1974; Collins, 1972).

Für die Synthese der cadmiumorganischen Verbindungen **45-49** wurden die Grignard-Lösungen auf 0°C abgekühlt und mit wasserfreiem CdCl_2 (24 Std. bei 10^{-1} mbar, über P_2O_5 getrocknet) versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Magnesiumsalze über eine Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abgetrennt. Für die Synthese der Phenylalkyldichlorphosphane **4**, **50-53** wurden die klaren Lösungen bei -78°C auf einen Überschuss an Phosphortrichlorid (4-10 äq.), welches in absolutem Ether gelöst war, getropft.

Nach vollständiger Zugabe wurde innerhalb von 1 Stunde auf RT erwärmt und noch weitere zwei Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Der Überschuss an PCl_3 , wie auch die Ummetallierung in die unreaktiveren cadmiumorganischen Verbindungen dienten zur Unterbindung der Mehrfachsubstitution des Phosphortrichlorids. Die als weißer Niederschlag ausgefallenen Cadmiumsalze wurden wiederum über eine Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert. Der Ether wie auch überschüssiges PCl_3 wurden jeweils im Membranpumpenvakuum abgetrennt und die Rückstände fraktioniert im Vakuum destilliert. Die Temperatur durfte dabei 150°C nicht übersteigen, da dies zu einer Zersetzung der Dichlorphosphane führt. Die Phenylalkyldichlorphosphane **4**, **50-53** konnten in Ausbeuten von 54-64% als klare Flüssigkeiten erhalten werden. Die Verbindungen Benzyldichlorphosphan **4**, 2-Phenylethyldichlorphosphan **50** und 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51** zeichnen sich durch einen äußerst unangenehmen Geruch aus. Die Charakterisierung der Verbindungen erfolgte durch ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie (siehe Kapitel 6.3.5).

Naphthylalkyldichlorphosphane 57 und 58

Das Reaktionsschema der Phenylalkyldichlorphosphane konnte erfolgreich für die Synthese von [(Naphth-1-yl)methyl]dichlorphosphan **57** und [3-(Naphth-1-yl)propyl]dichlorphosphan **58** herangezogen werden. Dabei konnten die Naphthylalkylhalogenide **20** und **56** mit Magnesium zu den entsprechenden Grignard-Reagenzien umgesetzt werden. Nach anschließender Ummetallierung mit CdCl_2 und Umsetzung der erhaltenen cadmiumorganischen Verbindungen mit PCl_3 wurden die gewünschten Zielverbindungen **57** und **58** erhalten (Abb. 6.8).

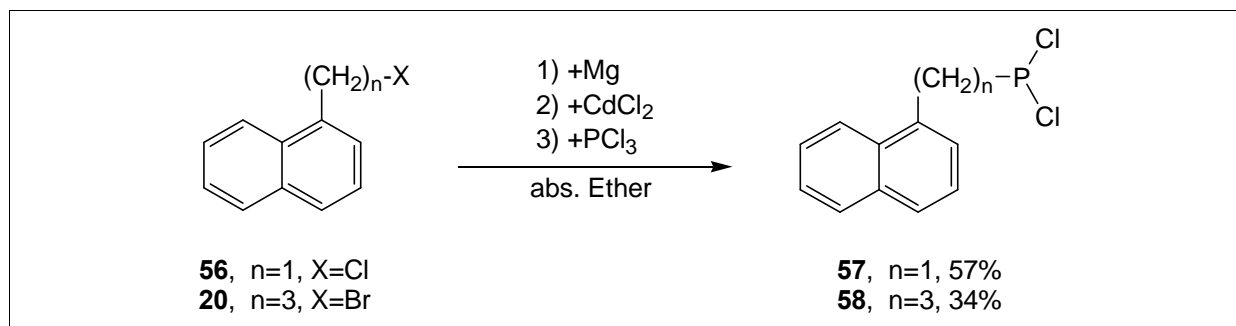


Abb. 6.8 Synthese von [(Naphth-1-yl)methyl]dichlorphosphan **57** und [3-(Naphth-1-yl)propyl]-dichlorphosphan **58**

Die Aufreinigung der Verbindungen erwies sich jedoch als problematisch. Das als öliges Produkt anfallende [(Naphth-1-yl)methyl]dichlorphosphan **57** konnte nur unter Hochvakuumbedingungen (10^{-5} mbar) mittels fraktionierter Destillation gereinigt werden. Das hochviskose [3-(Naphth-1-yl)propyl]dichlorphosphan **58** konnte nicht destilliert werden, da bei 140°C eine Zersetzung der Verbindung eintrat. Die Ausbeute wurde daher mittels der ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt. Für die weiteren Reaktionsschritte wurde das Rohprodukt eingesetzt.

Die Umsetzung von 3-(2-Naphthoxy)propylbromid **22** zum entsprechenden [3-(2-Naphthoxy)propyl]dichlorphosphan **59** verlief unter den bekannten Reaktionsbedingungen. Die Verbindung konnte jedoch nicht isoliert werden. Während der destillativen Abtrennung des Ether/ PCl_3 -Gemisches kam es zur Ausbildung von 2-Naphthoxydichlorphosphan **60** (Abb. 6.9).

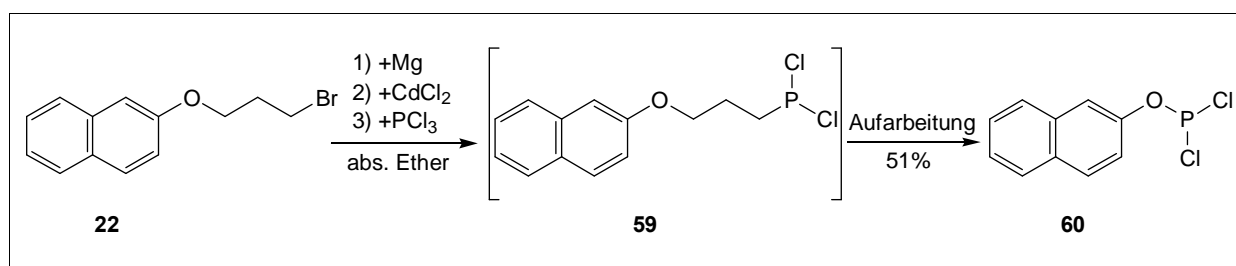


Abb. 6.9 Umsetzung von 3-(2-Naphthoxy)propylbromid **22** zum entsprechenden Dichlorphosphan **59**

Dabei führte das überschüssige PCl_3 zu einer Spaltung des Arylalkylethers **59** unter Ausbildung des Dichlorphosphans **60**. Dieses konnte in einer Ausbeute von 51% über fraktionierte Destillation isoliert werden. Um diese Folgereaktion zu unterbinden wurde der Überschuss an PCl_3 auf 1,5 äq. reduziert. Zudem wurde bei der Destillation des

Ether/ PCl_3 -Gemisches auf die Erwärmung der Lösung verzichtet. Es bildete sich jedoch auch unter diesen Bedingungen die Verbindung **60**. Das 2-Naphthoxydichlorphosphan **60** wurde den weiteren Reaktionsschritten unterzogen und das erhaltene Phosphoramidit in Oligonucleotide eingebaut, wodurch ein Triester-Rückgrat entstand. Dies ermöglichte den Vergleich zwischen einer Naphthylmodifikation die über eine P-O-Bindung und einer die über eine P-C-Bindung an das Rückgrat geknüpft ist.

Anthracenylalkyldichlorphosphate 61 und 62

Für die Synthese von [3-(Anthracen-9-yl)propyl]dichlorphosphan **62** wurde die für Phenylalkyldichlorphosphate etablierte Reaktionsabfolge abgeändert. Für die Umsetzung von 9-(3-Brompropyl)anthracen **26** mit Magnesium wurde 12 Stunden unter Rückfluss gekocht. Auf die Ummetallierung mit CdCl_2 musste verzichtet werden, da sich dabei ein teerartiger, unlöslicher Komplex ausbildete, so dass die Folgereaktion mit PCl_3 nicht mehr stattfand. Um Mehrfachsubstitutionen der reaktiven magnesiumorganischen Verbindung mit PCl_3 zu unterbinden, wurde die Grignard-Lösung sehr langsam bei -78°C innerhalb von 2 Stunden auf das Phosphortrichlorid getropft.

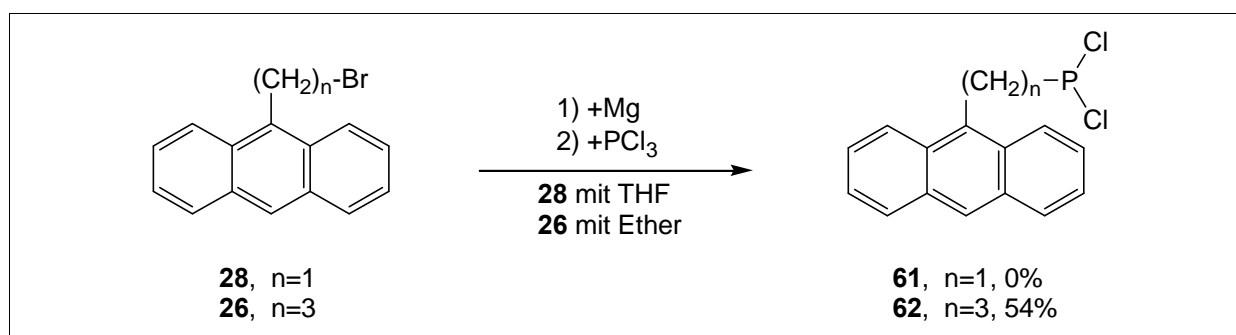


Abb. 6.10 Synthese von (Anthracen-9-yl)methyldichlorphosphan **61** und [3-(Anthracen-9-yl)propyl]dichlorphosphan **62**

Das als gelber Feststoff anfallende [3-(Anthracen-9-yl)propyl]dichlorphosphan **62** konnte nicht mittels Vakuumdestillation aufgereinigt werden, da bei 120°C eine Zersetzung der Verbindung eintrat. Die Ausbeute wurde daher mittels der ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt. Für die weiteren Reaktionsschritte wurde das Rohprodukt eingesetzt.

Die Darstellung von (Anthracen-9-yl)methyldichlorphosphan **61** gelang nicht. 9-(Brommagnesiummethyl)anthracen konnte dabei nicht unter normalen Grignard-Bedingungen dargestellt werden. Diese Zwischenverbindung konnte jedoch mit Magnesium-Anthracen (Bönnemann, 1983; Raston, 1984) oder hochaktivem Magnesium

nach Rieke (Rieke, 1974; Rieke, 1989; Fürstner, 1993) synthetisiert werden. Bei letzterem wurde in einer *in-situ*-Herstellung hochaktives Magnesiumpulver durch Reduktion von Magnesiumchlorid mit Kalium in THF dargestellt. Die Bildung der Grignard-Verbindung konnte mittels DC-Kontrolle beobachtet werden. Die Ummetallierung mit CdCl_2 wie auch die direkte Umsetzung der Grignard-Lösung mit PCl_3 gelang nicht. Der Grund hierfür könnte in der Komplexbildung des Anthracens mit dem Lösungsmittel THF liegen.

Substituierte Benzyldichlorphosphate 68-72

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Benzylmodifikationen synthetisiert, die in para-Stellung eine Methyl-, *t*-Butyl-, Methoxy- und Fluor-Gruppe tragen. Aufgrund der Reaktionsführung über die Grignard-Reaktion erschienen Carbonyl- und Aminosubstituenten als ungeeignet. Von Interesse für folgende Arbeiten sind ferner Phenyl-, Nitro-, Cyano- und Dimethylamino-Substituenten.

Die Reaktionen konnten mit Ausnahme der p-Methoxybenzylmodifikation in trockenem Ether durchgeführt werden. Da p-Methoxybenzylmagnesiumbromid in Ether ausfiel und im folgenden nicht weiterreagierte, wurde THF als Lösungsmittel gewählt. Die substituierten Benzyldichlorphosphate **68-72** konnten in guten Ausbeuten von 64-74% synthetisiert werden. Die Aufreinigung erfolgte mittels fraktionierter Vakuumdestillation.

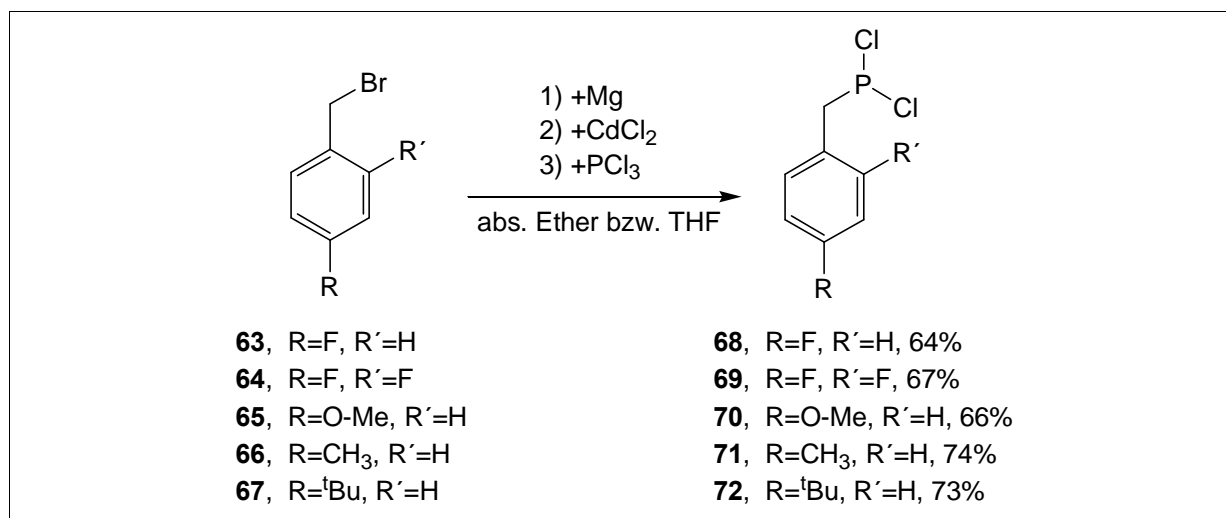


Abb. 6.11 Synthese der substituierten Benzyldichlorphosphate **68-72**

Eine Ausnahme stellte wiederum (p-Methoxybenzyl)dichlorphosphan **70** dar, welches als weißer Feststoff anfiel. Die Verbindung konnte nicht destilliert werden, da bei 130°C eine Zersetzung der Substanz eintrat. Die Ausbeute wurde daher ebenfalls mittels der ^1H -

und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt. Für die weiteren Reaktionsschritte wurde das Rohprodukt eingesetzt.

Des weiteren konnte 4-(4-Fluorphenyl)butylbromid **17** zu [4-(4-Fluorphenyl)butyl]dichlorphosphan **73** in einer Ausbeute von 40% umgesetzt werden (nicht graphisch dargestellt).

Heteroaromatische Arylalkyldichlorphosphate

Die Synthese von heteroaromatischen Arylalkyldichlorphosphanen stellt bis zum heutigen Zeitpunkt ein ungelöstes Problem dar. Weder 2-(Brommethyl)phenazin **32**, 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** noch 8-(Brommethyl)chinolin **39** ließen sich zu den entsprechenden Verbindungen umsetzen. Alle drei Substanzen konnten nicht unter normalen Grignard-Bedingungen mit Magnesium zur Reaktion gebracht werden. Mit Hilfe von hochreaktivem Magnesium nach Rieke konnten 2-(Brommethyl)phenazin **32** und 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** schließlich in die magnesiumorganische Verbindung überführt werden. Die Umsetzung mit Phosphortrichlorid gelang aber in beiden Fällen nicht. Das Phenazinderivat bildete in Anwesenheit von PCl_3 eine schwarze ölige Masse, während die Acridinverbindung nicht zur Reaktion gebracht werden konnte. Aufgrund der Unlöslichkeit von 8-(Brommethyl)chinolin **39** in diversen Ethern war diese Verbindung für die geplante Reaktionsabfolge ungeeignet.

Aufgrund dieser Probleme wurde ein abgeänderter Syntheseweg zur Darstellung von Arylalkyldichlorphosphanen gesucht. Ein Vorschlag, der während dieser Arbeit bereits erfolgreich für die Synthese von Benzylchlorphosphan **4** getestet wurde ist im folgenden kurz beschrieben.

Alternativer Syntheseweg

Wesentlicher Unterschied im Vergleich zur etablierten Methode ist die Darstellung einer entsprechenden Lithium-Arylalkyl-Verbindungen aus Arylalkylhalogeniden durch einen Halogen-Lithium Austausch mittels *n*-BuLi oder *t*-BuLi (Abb. 6.12). Benzylchlorid **1** wurde dabei bei -78°C mit *t*-BuLi umgesetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde innerhalb von 2 Stunden auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Kühlung auf 0°C erfolgte die Ummetallierung mit CdCl_2 .

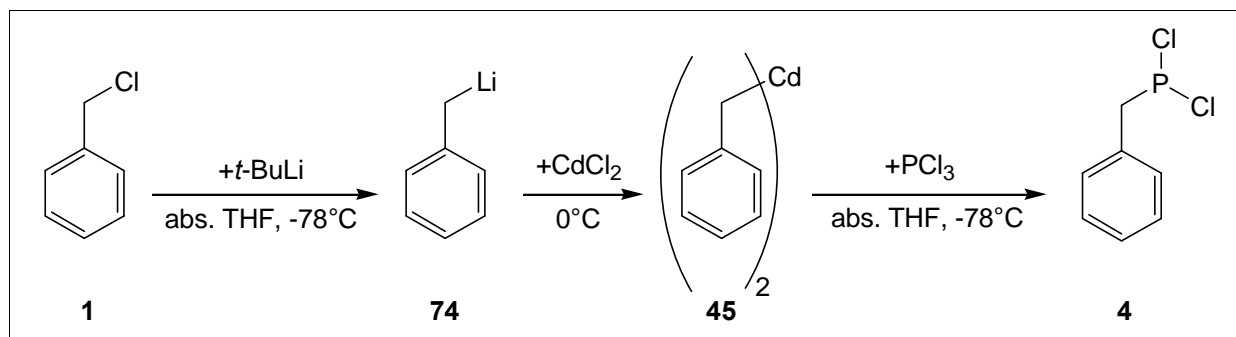


Abb. 6.12 Alternativer Syntheseweg zur Darstellung von Arylalkyldichlorphosphanen

Die weitere Reaktionsfolge mit PCl_3 wurde nicht geändert. Diese Synthesevariante ist besonders für Arylalkylhalogenide geeignet, die sich nicht oder nur schlecht mit Magnesium umsetzen lassen. Im Rahmen nachfolgender Arbeiten sollte für diese Arylalkylhalogenide dieser Weg der Reaktionsführung weitergeführt werden.

6.3.3 (Arylalkyl)(diisopropylamin)chlorphosphane **5**, **75-89**

Die Darstellung der Phosphorylierungsreagenzien **5**, **75-89** (Abb. 6.13-15) konnte jeweils unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Lediglich die Reaktionszeiten wurden zwischen einer und drei Stunden variiert. Für die Synthesen wurden die Arylalkyldichlorphosphane in trockenem Methylendichlorid gelöst und unter Argonatmosphäre bei -30°C bis -40°C tropfenweise mit zwei Äquivalenten *N,N*-Diisopropylamin versetzt. Ein Äquivalent der Base reagiert in einer Substitutionsreaktion zu dem gewünschten Phosphorylierungsreagenz, während das zweite dem Abfangen des freigesetzten Chlorids dient. Das dabei entstehende Diisopropylammoniumchlorid fiel als weißer Niederschlag aus. Die Reaktionslösung wurde nach vollständiger Zugabe innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur erwärmt. In Abhängigkeit der synthetisierten Modifikation wurde noch ein bis drei Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde im Anschluss über eine Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abgetrennt und das Methylendichlorid abdestilliert. Die Phenylalkyl(diisopropylamin)chlorphosphane **5**, **75-78** (Abb. 6.13) wie auch die meisten substituierten Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphane (Abb. 6.15) konnten mittels fraktionierter Hochvakuumdestillation aufgereinigt werden.

Im Falle des (5-Phenylpentyl)(diisopropylamin)chlorphosphans **78** begann sich die Verbindung ab einer Temperatur von 160°C zu zersetzen, was die niedrige Ausbeute von 38% erklärt.

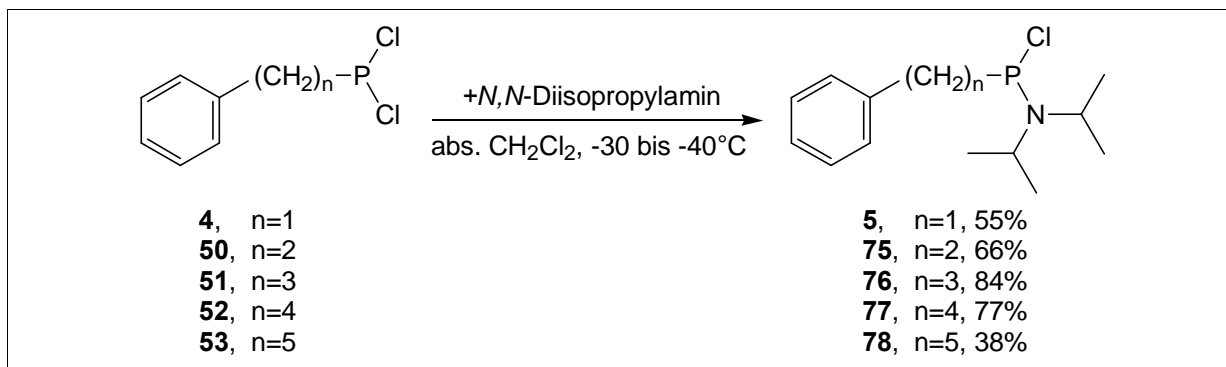


Abb. 6.13 Synthese der Phenylalkyl(diisopropylamin)chlorphosphane **5, 75-78**

Die Phosphorylierungsreagenzien [(Naphth-1-yl)methyl](diisopropylamin)chlorphosphan **79**, [3-(Naphth-1-yl)propyl](diisopropylamin)chlorphosphan **80**, [3-(Anthracen-9-yl)propyl](diisopropylamin)chlorphosphan **81** (Abb. 6.14) und (p-Methoxybenzyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **84** konnten nicht fraktioniert destilliert werden. Die Ausbeute wurde daher mittels der ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt. Aus diesem Grund wurde für die weitere Umsetzung mit den geschützten Nucleosiden das Rohprodukt eingesetzt.

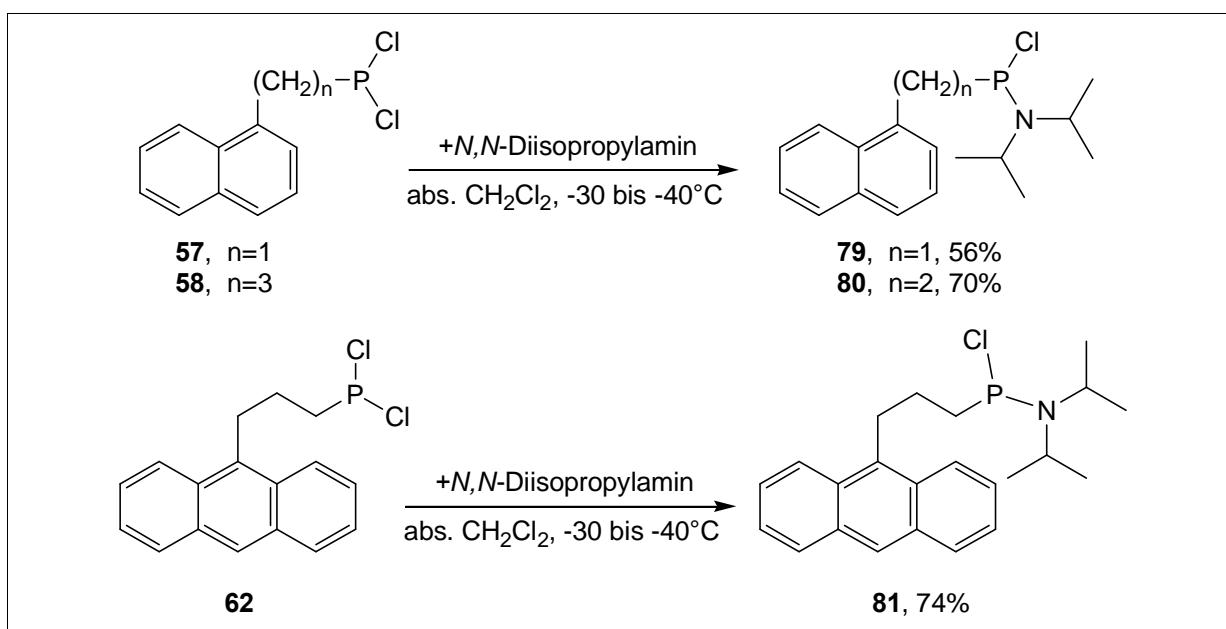


Abb. 6.14 Synthese der Phosphorylierungsreagenzien **79-81**

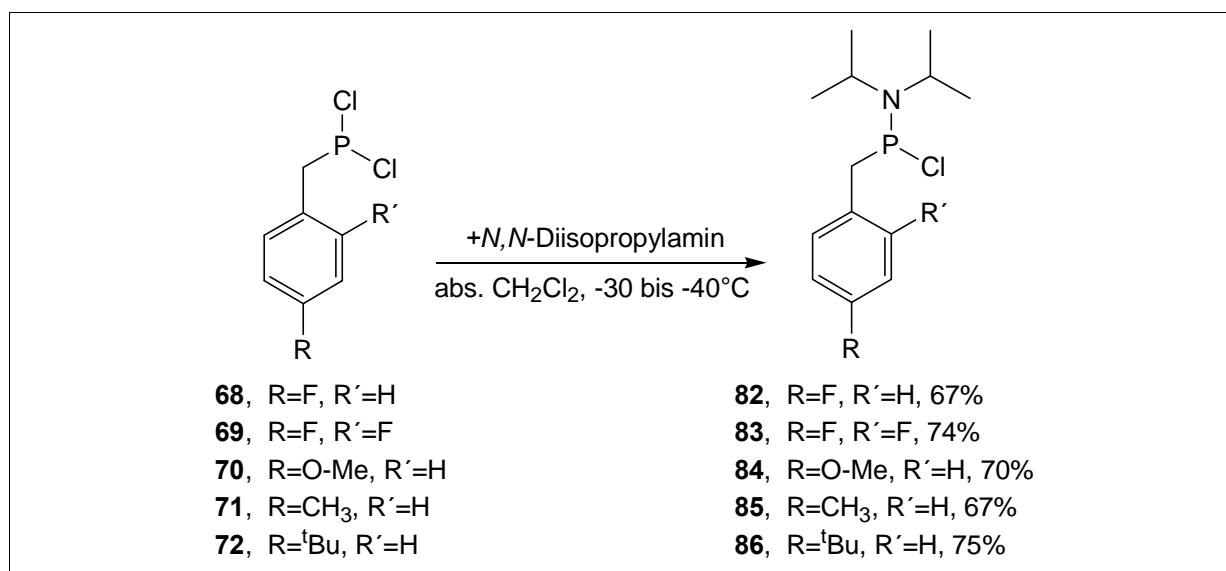


Abb. 6.15 Synthese der substituierten (Benzyl)(diisopropylamin)chlorphosphane **82-86**

Als weitere Phosphorylierungsreagenzien wurden Methyl(diisopropylamin)chlorphosphan **87**, 4-(4-Fluorphenyl)butyl[diisopropylamin]chlorphosphan **88** und (2-Naphthoxy)(diisopropylamin)chlorphosphan **89** dargestellt (nicht graphisch dargestellt).

6.3.4 Synthese der arylalkylmodifizierten Phosphoramidite

Für die Synthese der modifizierten Phosphoramidite wurden die dargestellten (Arylalkyl)(diisopropylamin)chlorphosphane mit den geschützten Nucleosiden **91**, **94**, **95** und **98** zur Reaktion gebracht. Die Synthese der entsprechenden Nucleotid-Bausteine ist in Abb. 6.16 und 6.17 schematisch dargestellt. Bei den natürlichen Nucleosiden Cytidin, Adenosin, Thymidin und Guanosin war die 5'-Hydroxylgruppe jeweils mit der 4,4'-Dimethoxytritylgruppe blockiert. Diese säurelabile Schutzgruppe kommt standardmäßig bei der Oligonucleotid-Festphasensynthese zum Einsatz. Die exocyclische Aminofunktion der Nucleobasen lag ebenfalls geschützt vor. Aufgrund der Abspaltungsgeschwindigkeiten der Schutzgruppen wurden Guanosin mit der Isobutyryl- und Adenosin mit der Benzoylgruppe versehen. Cytosin wird bei der Standard-Oligonucleotidsynthese häufig benzoylgeschützt. Da jedoch beim entschützen von *N*⁴-Benzoyl-2'-desoxycytidin-Bausteinen in Methyl- oder Benzylphosphonaten mittels Ethylendiamin Transaminierungsreaktionen beobachtet wurden, kam die Isobutyrylgruppe zum Einsatz. Unter Verwendung dieser Schutzgruppe kann diese Nebenreaktion unterbunden werden (Reddy, 1996). Auf die literaturbekannten Darstellungen der

geschützten Nucleoside wird hier nicht näher eingegangen. Die Synthesevorschriften sind in Kapitel 12.1.2 beschrieben.

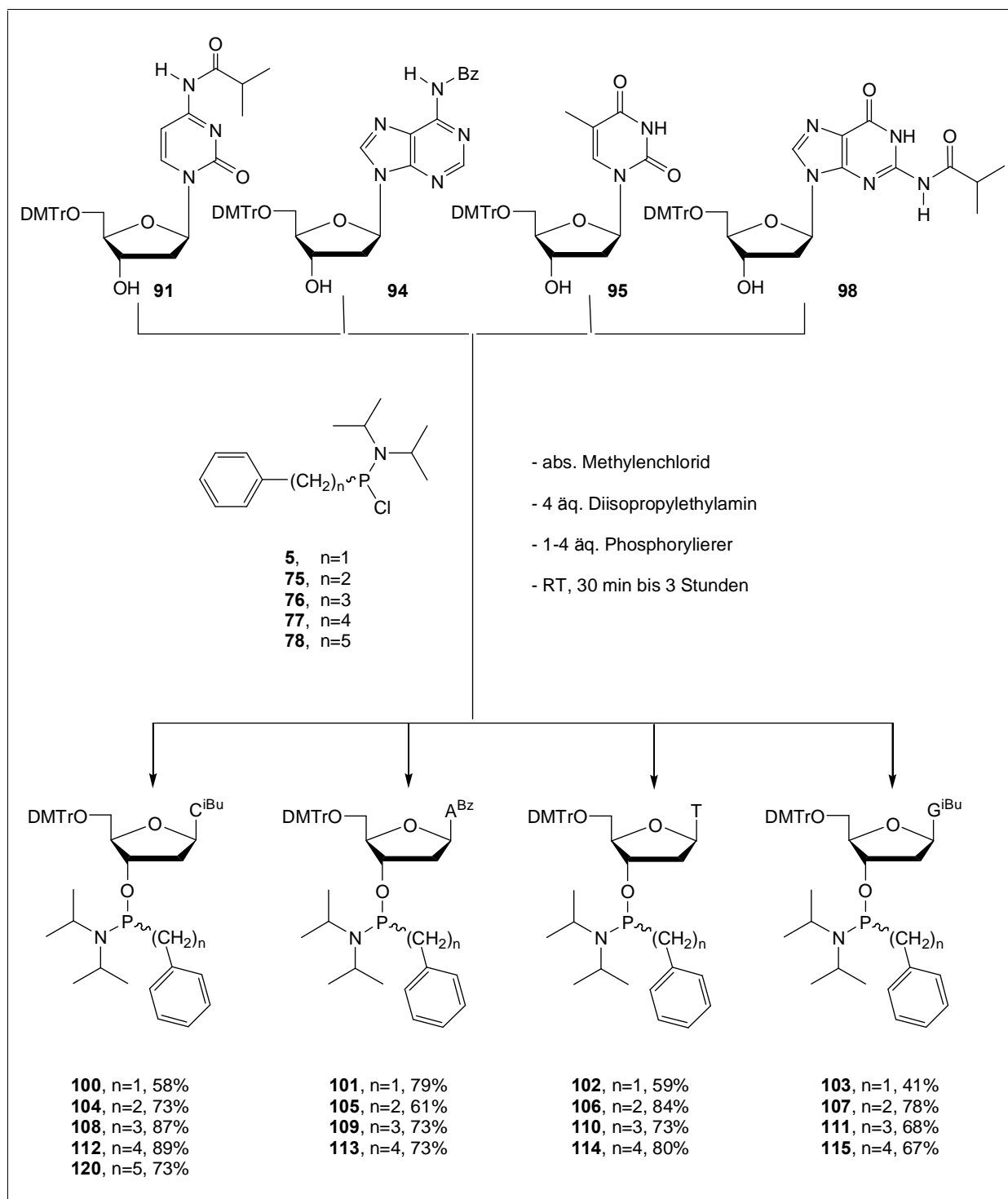


Abb. 6.16 Syntheschema für die Darstellung der phenylalkylmodifizierten Phosphoramidite **100-115** und **120**.

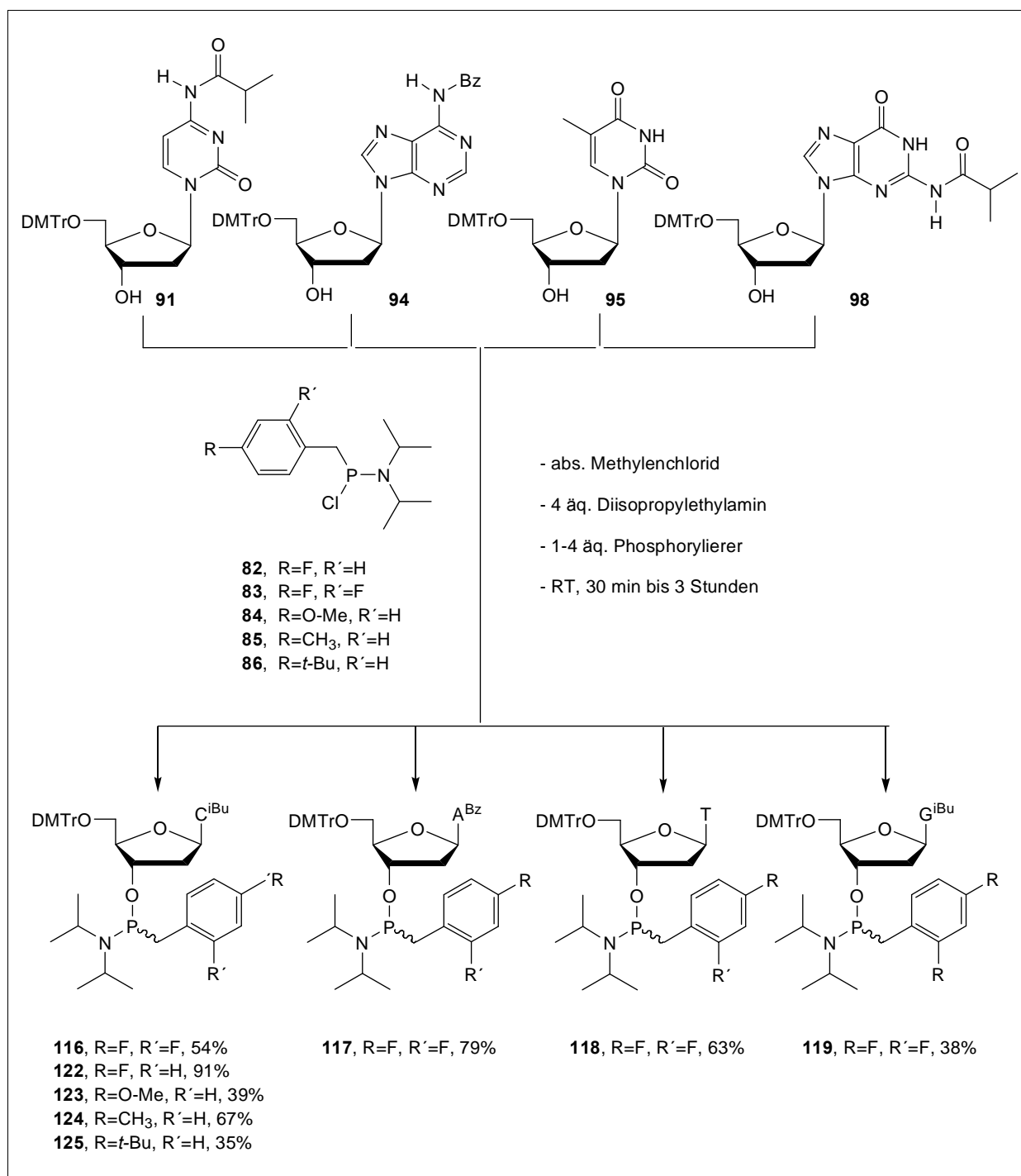


Abb. 6.17 Syntheschema für die Darstellung der substituierten benzylmodifizierten Phosphoramidite **116-119** und **122-125** für die Oligonucleotid-Festphasensynthese.

Für die Synthese der Phosphoramidite wurden jeweils die sehr gut getrockneten, voll geschützten Nucleoside **91**, **94**, **95** und **98** unter Argon-Atmosphäre in absolutem Methylenchlorid gelöst und mit vier Äquivalenten Diisopropylethylamin (DIPEA), welches als Säurefänger fungiert, versetzt. Die Lösungen wurden im Anschluss bei Raumtemperatur tropfenweise mit 1 bis 4 Äquivalenten mit dem jeweiligen

Phosphorylierungsreagenz versetzt und 30 Minuten bis 3 Stunden gerührt. Die Mischung wurde auf 0°C gekühlt und mit 5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung versetzt, wodurch die Reaktion abgebrochen wurde. Das bei unmodifizierten Phosphoramiditen als Syntheseabbruchreagenz zum Einsatz kommende Methanol führt bei den arylalkylmodifizierten Analoga zu Zersetzungs- und Oxidationsprodukten. Nach der Aufarbeitung konnten die Phosphoramidite mittels Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt werden. Als Laufmittel der Wahl haben sich dabei Gemische aus Essigsäureethylester und *n*-Hexan bewährt, welche mit 1% Triethylamin (TEA) versetzt wurden. Die Anwesenheit von Triethylamin, wie auch eine kurze Verweildauer der Phosphoramidite (<1 Stunde) auf der Kieselgelsäule, führten zu einer deutlichen Reduzierung der Zersetzungsprodukte. Die als Diastereoisomerengemische im Verhältnis 1:1 anfallenden Phosphoramidite wurden als weiße Schäume isoliert. Die benzyl- (**5**), 2-phenylethyl- (**75**), 3-phenylpropyl- (**76**), 4-phenylbutyl- (**77**) und 2,4-difluorbenzylmodifizierten (**83**) Phosphorylierer wurden mit allen vier geschützten Nucleosiden zur Reaktion gebracht. Die daraus resultierenden Phosphoramidite **100-107** und **112-119** kamen u.a. bei der Synthese der Antisense-Oligonucleotide zum Einsatz. Die 3-phenylpropylmodifizierten Phosphoramidite **108-111** wurden zur Synthese von Dimeren und der anschließenden Strukturaufklärung mittels NMR herangezogen.

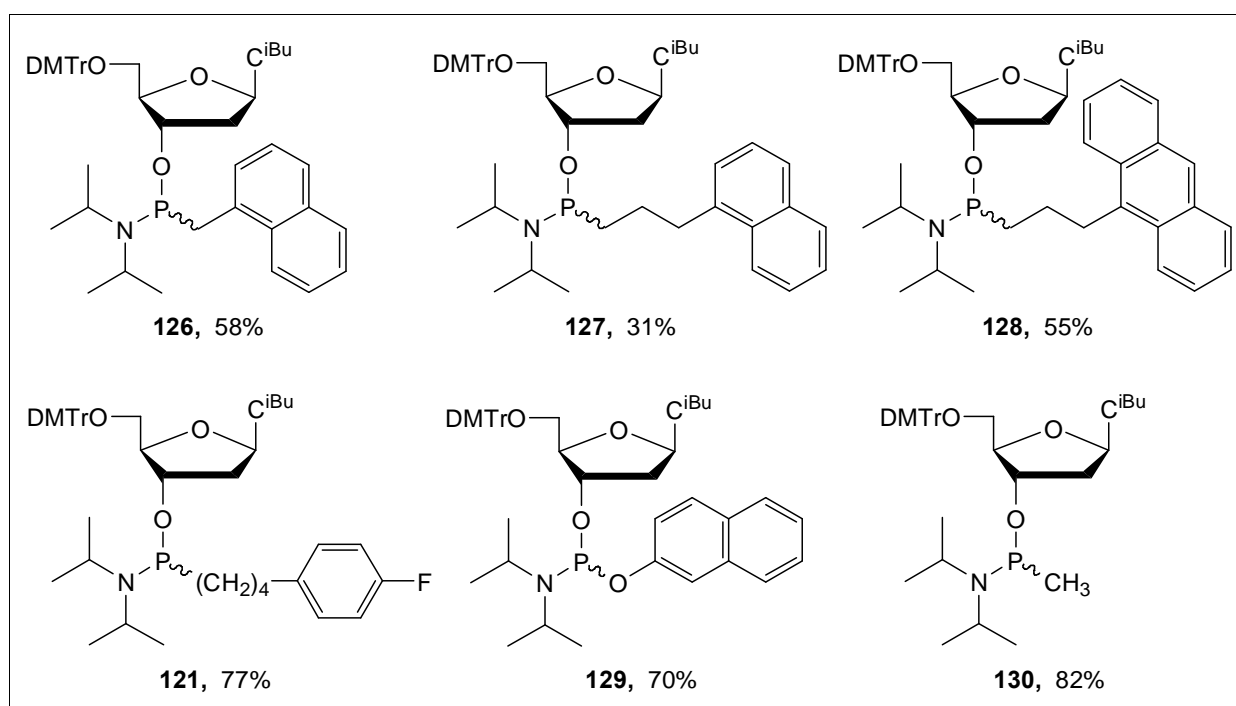


Abb. 6.18 Weitere synthetisierte, modifizierte 2'-Desoxycytidin-Bausteine **121**, **126-130**

Die weiteren modifizierten Phosphorylierer wurden aufgrund der gewählten Sequenzen der Modell-Oligonucleotide nur mit dem geschützten 2'-Desoxycytidin zur Reaktion gebracht. In Abbildung 6.18 sind die nicht in den Syntheschemata 6.16 und 6.17 aufgeführten, synthetisierten 2'-Desoxycytidin-Bausteine **121** und **126-130** aufgeführt.

6.3.5 ^{31}P -NMR-Spektren der P(III)-Verbindungen

Die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen erfolgte unter anderem mittels ^{31}P -NMR-Untersuchungen. Die erhaltenen charakteristischen ^{31}P -NMR-Spektren (^1H -entkoppelt, gemessen in CDCl_3) der stufenweise durchgeführten Substitution von PCl_3 bis hin zum arylalkylmodifizierten Phosphoramidit ist anhand der 3-Phenylpropylmodifikation im folgenden dargestellt. Phosphortrichlorid weist bei ^{31}P -NMR-Messungen eine chemische Verschiebung von 220,80 ppm auf. Durch die Einführung eines Arylalkylrestes wird das Signal signifikant in Richtung höheres Feld verschoben. 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51** zeigt eine chemische Verschiebung von 195,27 ppm (Abb. 6.19). Die Signale aller synthetisierten Arylalkyldichlorphosphane lagen im Bereich zwischen 180 und 200 ppm. Im Rahmen der Synthese wurden in den meisten Fällen Arylalkylbromide als Ausgangsverbindungen eingesetzt (Kap. 6.3.1). Der Einschub in Abbildung 6.19 zeigt ein ^{31}P -NMR-Spektrum nach der Synthese von 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51** bei der nach der Ummetallierung auf die Abtrennung des Niederschlages verzichtet wurde. Als Folge davon bildete sich durch Halogenaustausch zu etwa 15% (3-Phenylpropyl)bromchlorphosphan **131** aus. Für den folgenden Reaktionsschritt zum (3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **76** konnte jedoch auch dieses Substanzgemisch eingesetzt werden. Wurde nicht vollständig unter Feuchtigkeitsausschluss gearbeitet kommt es zu einer partiellen Hydrolyse der Verbindung. Im ^{31}P -NMR-Spektrum führt dies zu einem um ca. 15 ppm hochfeldig verschobenen Signal von (3-Phenylpropyl)(chlor)hydroxyphosphan **132**.

Der zweite Substitutionsschritt zur Synthese von (3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **76** führt zu einer weiteren charakteristischen Verschiebung des ^{31}P -NMR-Signals zu höherem Feld (Abb. 6.20). Alle synthetisierten (Arylalkyl)(diisopropylamin)chlorphosphane wiesen ein ^{31}P -NMR-Signal zwischen 133 und 142 ppm auf. Erstaunlicherweise zeigten die als Diastereoisomerenpaar vorliegenden Verbindungen jeweils nur ein Signal.

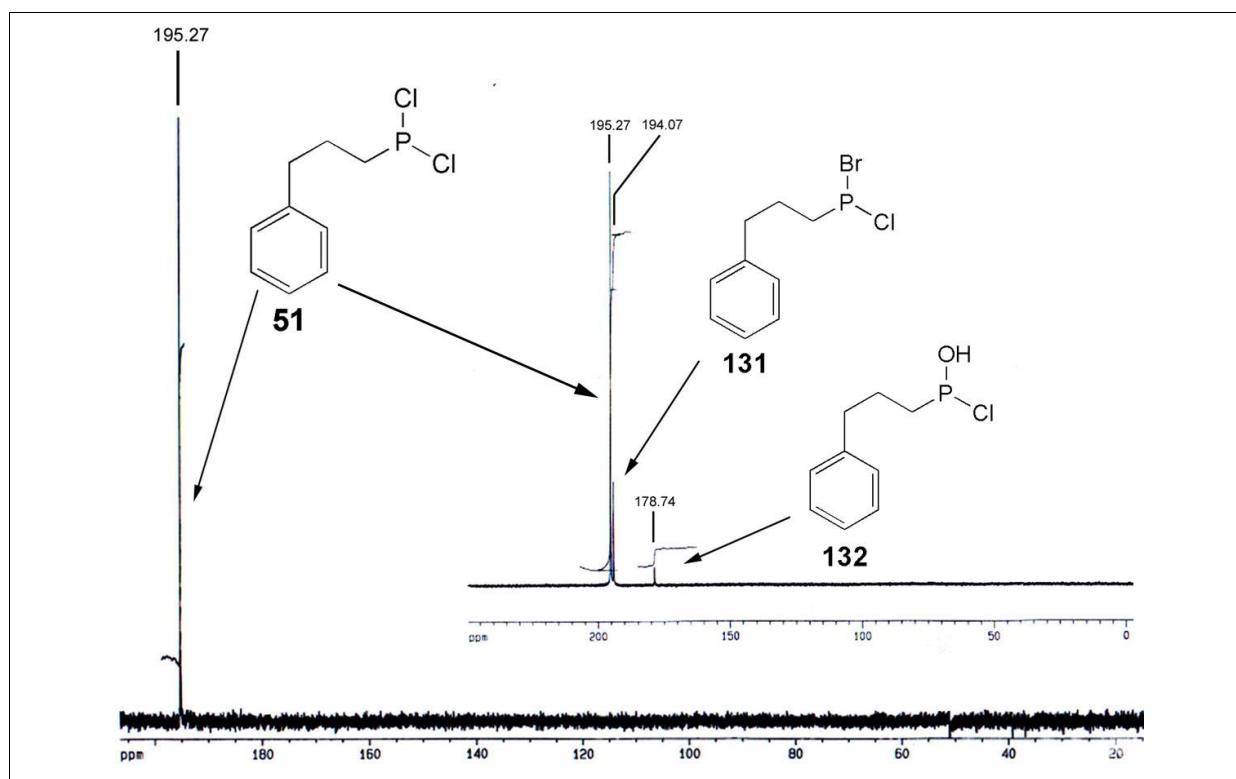


Abb. 6.19 ^{31}P -NMR-Spektrum von 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51**. Einschub: Spektrum nach Veränderung der Reaktionsführung (Niederschlag nach der Ummetallierung nicht abgetrennt).

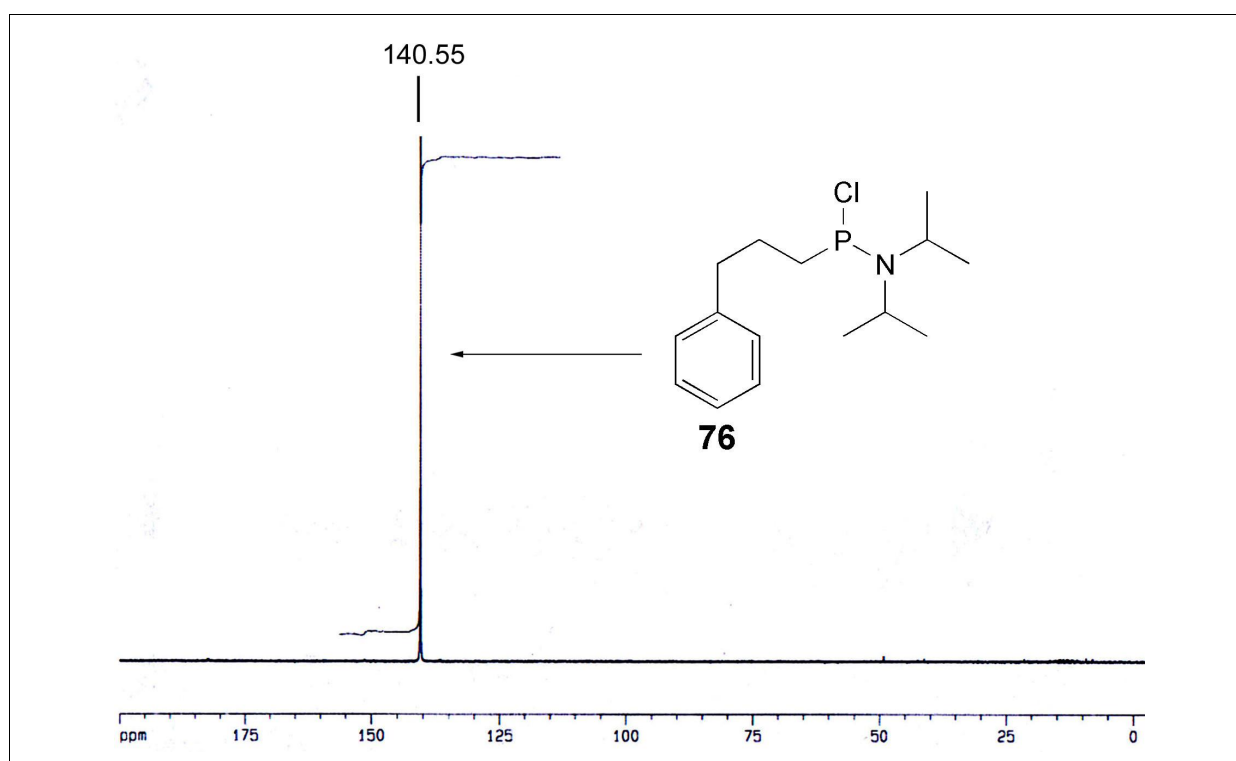


Abb. 6.20 ^{31}P -NMR-Spektrum (3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **76**

Mit der Ankupplung der arylalkylmodifizierten Phosphorylierungsreagenzien an die geschützten Nucleoside ist eine weitere signifikante Verschiebung des ^{31}P -NMR-Signals ins höhere Feld verbunden (Abb. 6.21). Die ^{31}P -NMR-Signale lagen bei allen Phosphoramiditen zwischen 116 und 129 ppm. Die Phosphoramidite fielen als Diastereoisomerengemische im Verhältnis 1:1 an. In Abbildung 6.21 ist dies sehr gut am Beispiel des 3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **108** ersichtlich.

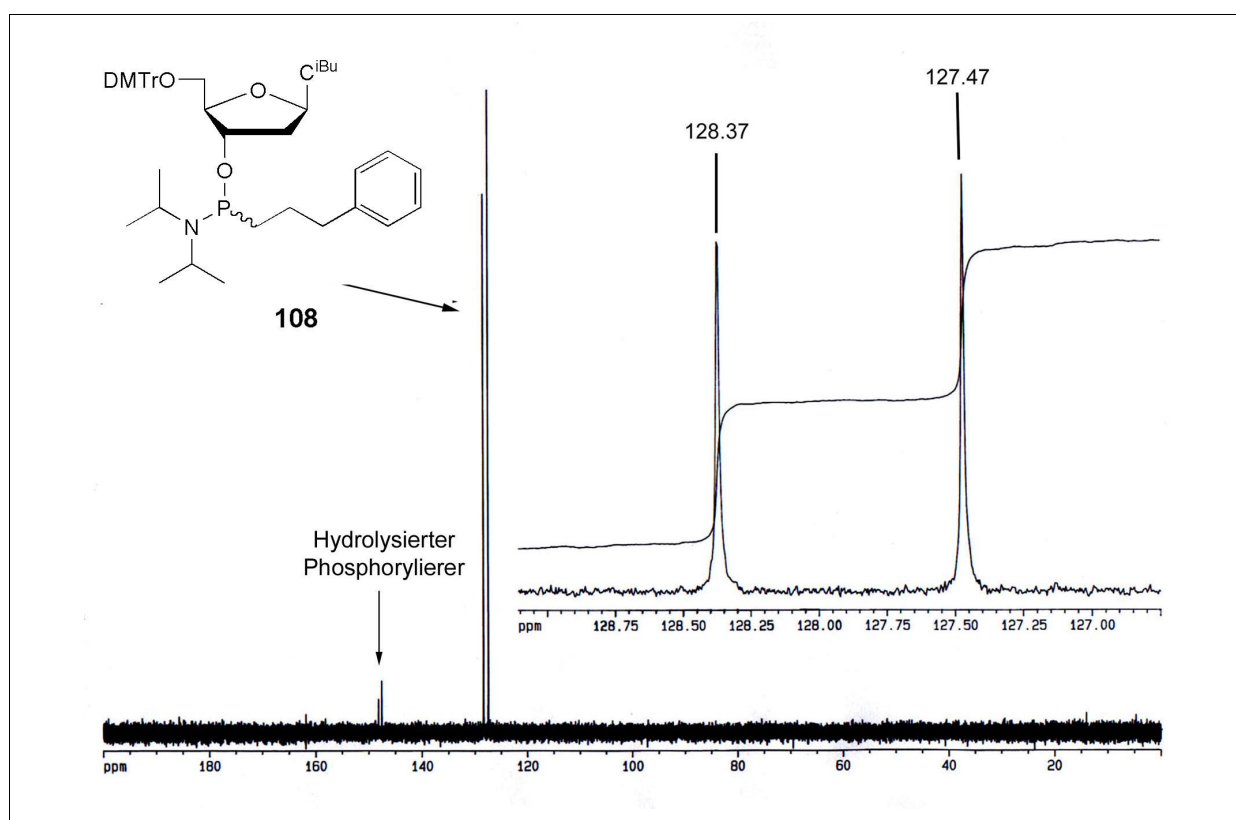


Abb. 6.21 ^{31}P -NMR-Spektrum von 3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **108**

6.4 Arylalkylmodifizierte Nucleotid-Dimere

6.4.1 Synthese der Dimere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Dimere mit einer internucleosidischen 3-Phenylpropylphosphonatbindung synthetisiert. Die Wahl fiel dabei auf die Sequenzen 5'-d(T_{3Pp}T), 5'-d(C_{3Pp}G) und 5'-d(A_{3Pp}T), da die analogen Methylphosphonate und Benzylphosphonate bereits untersucht wurden. Des weiteren wurde ein 2,4-difluorbenzylmodifiziertes 5'-d(C_{D_{FB}}G) Dimer synthetisiert.

Die für die Dimersynthese in Lösung erforderliche Aktivierung der Phosphoramidite erfolgte mittels Benzimidazoliumtriflat **134** (Hayakawa, 1996). Unter Verwendung dieses Aktivators konnten bei Dimersynthesen mit voluminösen Rückgratmodifikationen deutlich höhere Kupplungsausbeuten als mit 1*H*-Tetrazol und 5-(*p*-Nitrophenyl)-1*H*-tetrazol (NPT) erzielt werden. Ferner löst sich Benzimidazoliumtriflat **134** hervorragend in Acetonitril, ist feuchtigkeitsunempfindlich und bei Raumtemperatur lagerfähig. Für die Synthese des Aktivators wurde Trifluormethansulfonsäure in Methylenchlorid gelöst und das ebenfalls in CH₂Cl₂ gelöste Benzimidazol **133** langsam bei Raumtemperatur zugetropft (Abb. 6.22). Das dabei ausgefallene Benzimidazoliumtriflat **134** wurde abfiltriert und aus Essigester/Acetonitril (4:1) umkristallisiert.

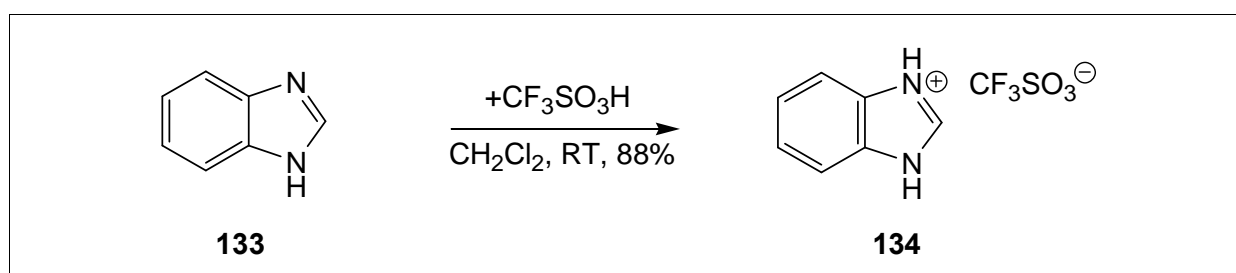


Abb. 6.22 Synthese von Benzimidazoliumtriflat **134**

Für die Synthese der Dimere wurden jeweils die Phosphoramidite **108**, **109** oder **110** sowie die entsprechenden, an der 5'-Hydroxygruppe ungeschützten Nucleoside **96** oder **99** in äquimolaren Mengen eingewogen. Nach Zugabe von 2 Äquivalenten Benzimidazoliumtriflat **134** wurde das Substanzgemisch 24 Stunden im Vakuum (10^{−1} mbar) getrocknet. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe des als Lösungsmittel verwendeten absoluten Acetonitrils (Abb. 6.23). Die Mischung wurde 45 Minuten unter

Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von 3 Äquivalenten Tetrabutylammoniumperiodat, welches in Methylenchlorid suspendiert war (Cosstick, 1990). Die Verwendung von *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) für den Oxidationsschritt erwies sich als ungeeignet, da sich dadurch die Ausbeute drastisch verringerte. Nach 10-minütigem Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 5%iger Na₂SO₃-Lösung abgebrochen. Im Anschluss wurde weiter aufgearbeitet und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert. Die präparative Trennung der jeweils im Rohprodukt in einem Verhältnis von 1,5:1 (Rp:Sp) gebildeten Diastereoisomerenpaare gelang mittels Normalphasen-HPLC an einer Nucleoprep. 650x50 Säule. Für die Isomerentrennung des Dimers 5'-d(Ap_{3Pp}T) **135Rp/Sp** wurde ein isokratischer Eluent aus Essigsäureethylester/Isopropylamin (10:0,5), für 5'-d(Tp_{3Pp}T) **136Rp/Sp** aus Methylacetat/Dioxan (10:1) und für 5'-d(Cp_{3Pp}G) **137Rp/Sp** von (Methylacetat/Dioxan 10:1)/Hexan (1:1) verwendet.

Dem rascher eluierenden Isomer wird im folgenden die Rp-Konfiguration zugewiesen, dem langsamer eluierenden Isomer die Sp-Konfiguration. Auf die Zuordnung der absoluten Konfiguration (Sp oder Rp) wird in Kapitel 9.2 ausführlich eingegangen. Aufgrund von Peaküberlagerungen bei der präparativen HPLC-Trennung kam es teilweise zu Ausbeuteverlusten.

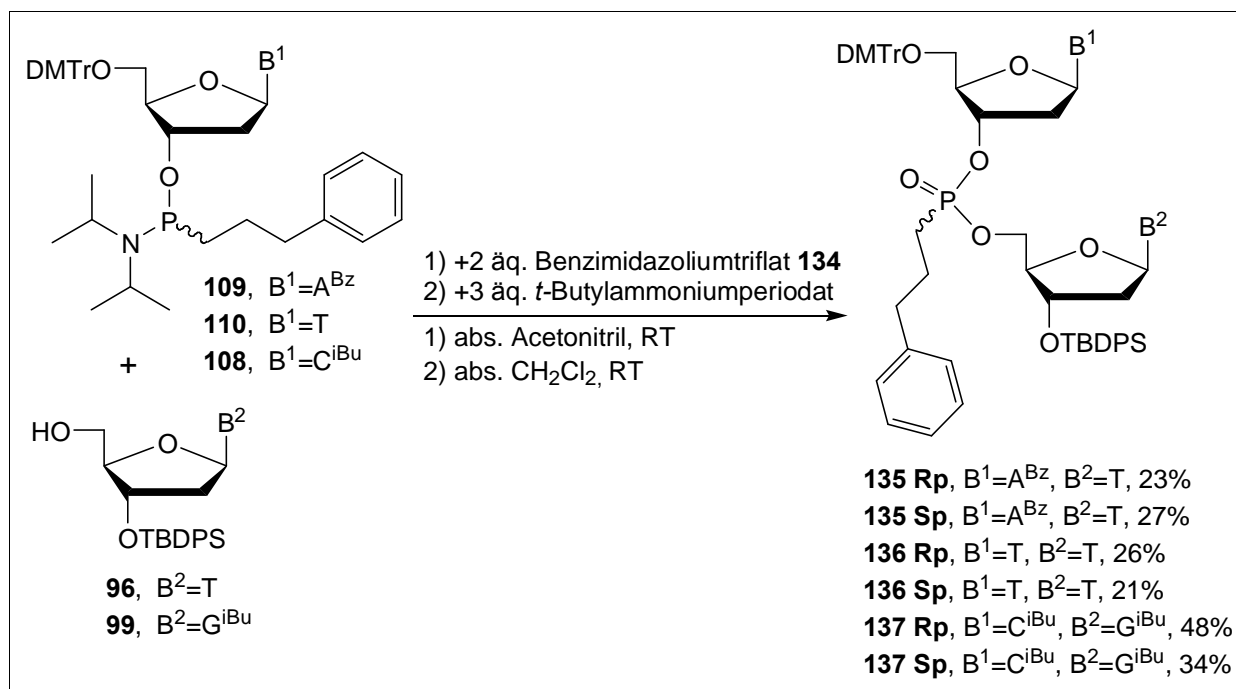


Abb. 6.23 Synthese der 3-Phenylpropyl-Rückgrat modifizierten Dimere **135-137 Rp/Sp**

Die Gesamtausbeute an diastereoisomerenreinen 3-phenylpropylmodifizierten Dimeren lag mit 50% für **135**, 47% für **136** und 82% für **137** jedoch teilweise deutlich über den Ausbeuten, die bei der Synthese von methyl- und benzylmodifizierten Dimeren (Lehmann, 2001; Schweitzer, 1998) erzielt wurden.

Die Synthese des 2,4-difluorbenzylmodifizierten CG-Dimers (5'-d(Cp_{D_{FB}}G) **138Rp/Sp** erfolgte unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie für die 3-phenylpropylmodifizierten Dimere **135-137Rp/Sp** (Abb. 6.24). Die Trennung des Isomerenpaares erfolgte ebenfalls mittels Normalphasen-HPLC unter Verwendung eines isokratischen Gradienten aus Methylacetat/Dioxan (10:1). Das **Rp**-konfigurierte Isomer **138** konnte mit einer Ausbeute von 27%, das **Sp**-konfigurierte Isomer **138** mit einer Ausbeute von 23% isoliert werden.

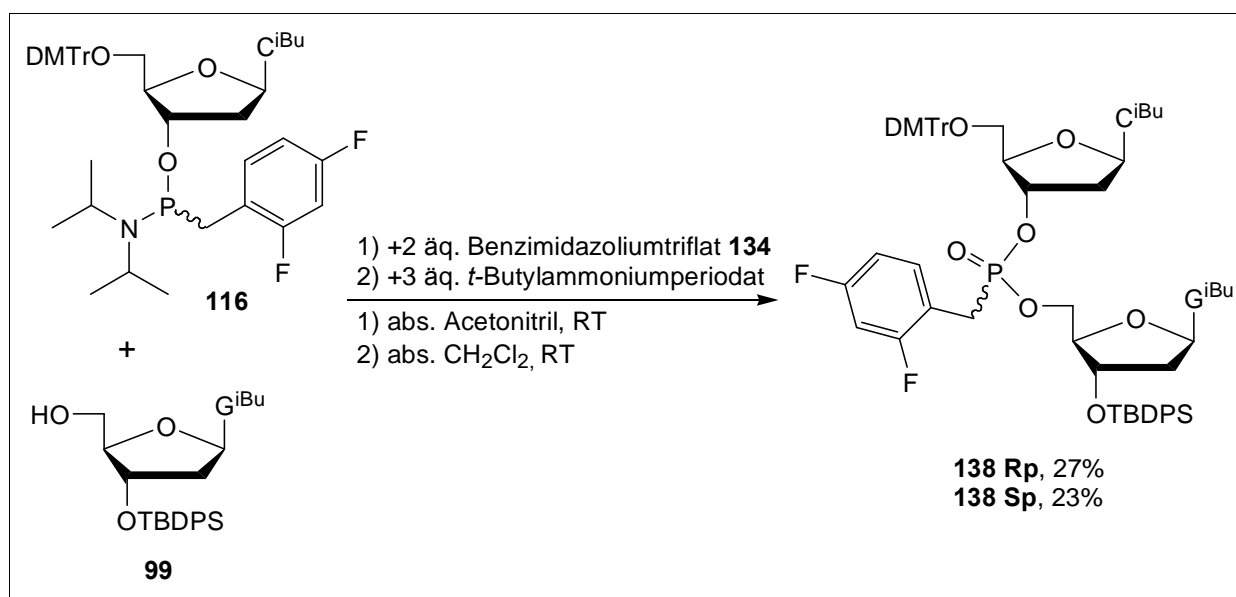


Abb. 6.24 Synthese der 2,4-Difluorbenzyl-Rückgrat modifizierten CG-Dimere **138 Rp/Sp**

6.4.2 Entschützung / Synthese der Phosphoramidit-Dimere

Die voll geschützten diastereoisomerenreinen Dimere 5'-(Ap_{3Pp}T) **135**, 5'-(Tp_{3Pp}T) **136**, 5'-(Cp_{3Pp}G) **137** und 5'-(Cp_{D_{FB}}G) **138** wurden für die Ermittlung der absoluten Konfiguration der Modifikation mittels 2D-ROESY-NMR herangezogen. Ferner sollten die voll entschützten Isomere des Dimeres **137** 2D-ROESY-NMR spektroskopisch untersucht werden (siehe Kapitel 9.2.2). Zudem wurden die Dimere **137Rp/Sp** und **138Rp/Sp** in kupplungsfähige Phosphoramidite überführt (Abb. 6.25 und 6.26).

Der erste Schritt der Entschützung war die Abspaltung der 3'-Hydroxylschutzgruppe. Die während dieser Arbeit ausschließlich verwendete *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe (TBDPS) lässt sich leicht und selektiv durch die Behandlung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entfernen. Dabei wurden die Dimere **137Rp**, **137Sp** (Abb. 6.26) und **138Rp** und **138Sp** (Abb. 6.25) in absolutem THF gelöst und bei Raumtemperatur mit TBAF-Lösung versetzt (Smith, 1997). Nach ca. einer Stunde war die Abspaltung beendet. Die nach chromatographischer Reinigung erhaltenen Ausbeuten lagen bei dem 3-phenylpropylmodifizierten CG-Dimer **139** bei 84% für das **Rp**- und bei 82% für das **Sp**-konfigurierte Isomer. Im Falle des 5'-d(Cp_{DFB}G) Dimers **143** lagen die Ausbeuten jedoch für beide Isomere unter 60%. Dünnschichtchromatographisch lies sich allerdings keine Bildung von Nebenprodukten bzw. Zersetzungsprodukten nachweisen. Die Ausbeuteverluste sind vermutlich auf die chromatographische Aufreinigung zurückzuführen.

Die freie 3'-Hydroxylgruppe der Verbindungen **139Rp**, **139Sp**, **143Rp** und **143Sp** wurde mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphoramidit [auch: Phosphorigsäuremono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamidchlorid] zu den kupplungsfähigen Phosphoramiditen **140Rp**, **140Sp**, **144Rp** und **144Sp** umgesetzt. Diese Reaktion kann vollständig analog zu der Phosphorylierung von monomeren Nucleosiden durchgeführt werden. Die Dimere wurden dabei jeweils in absolutem Methylenchlorid gelöst und mit 4 äq. Diisopropylethylamin versetzt. Zu dieser Lösung wurde das Phosphorylierungsreagenz zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von 2 bis 3 Stunden wurde die Reaktion abgebrochen und der Ansatz aufgearbeitet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel wurden die Phosphoramidit-Dimere in Ausbeuten zwischen 48% und 78% erhalten. Die Charakterisierung der als Diastereoisomerenpaar entstandenen Phosphoramidite erfolgte mittels ¹H- und ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie über ESI-MS-Messungen. Die Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe der Verbindungen **139Rp** und **139Sp** erfolgte mittels 2%iger Benzolsulfonsäure. Dazu wurden die Verbindungen in Methylenchlorid gelöst und mit einer 2%igen Benzolsulfonsäure-Lösung (CH₂Cl₂/MeOH 7:3) versetzt. Nach 5 Minuten war die Schutzgruppe jeweils vollständig entfernt. Nach Aufarbeitung und Chromatographie an Kieselgel konnten die Dimere **141Rp** in 52%iger und **141Sp** in 75%iger Ausbeute erhalten werden (Abb. 6.25). Für die Abspaltung der Aminoschutzgruppen wurden die Dimere mit 32%igem Ammoniak versetzt und 36 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Ammoniak wurde abdestilliert und die vollständig entschützten Dimere **142Rp** und **142Sp** mittels RP-HPLC (Elution mittels Wasser/Methanol) aufgereinigt.

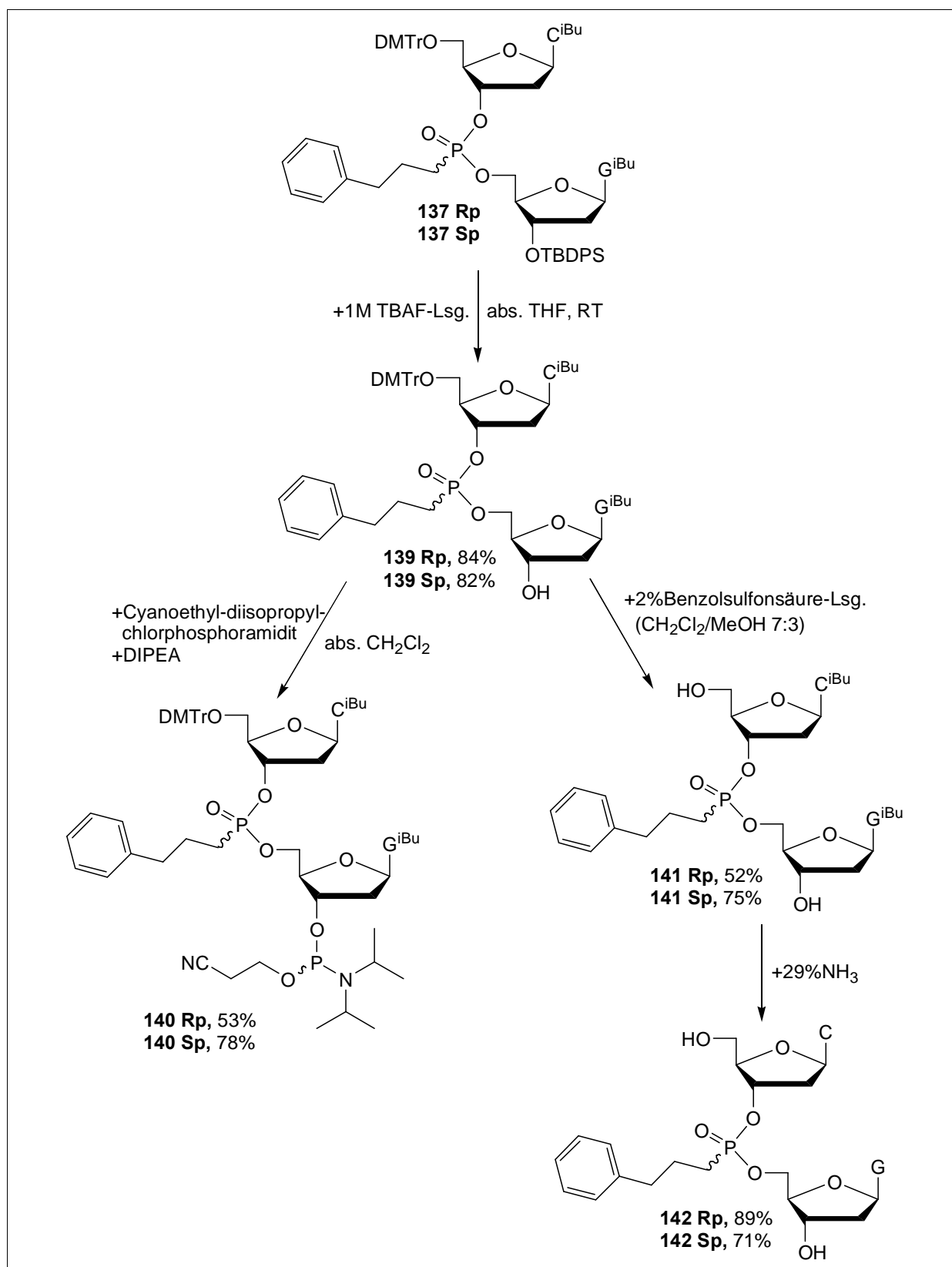


Abb. 6.25 Synthese der 3-Phenylpropyl-Rückgrat modifizierten, voll entschützten CG-Dimere **142Rp** und **142Sp**, Synthese der 3-Phenylpropyl-Rückgrat modifizierten Phosphoramidit-Dimere **140Rp** und **140Sp**

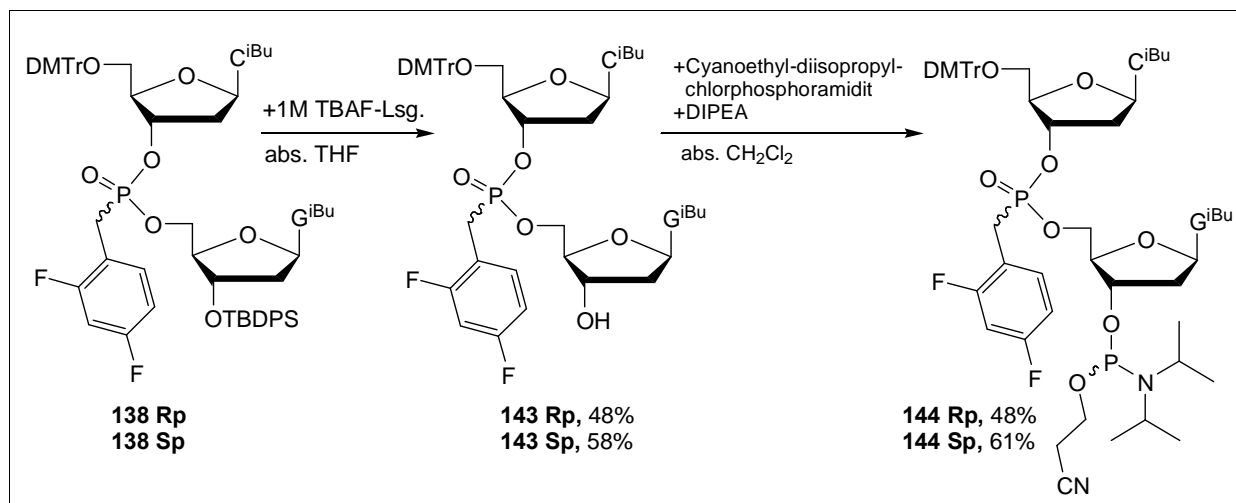


Abb. 6.26 Synthese der 2,4-Difluorbenzyl-Rückgrat modifizierten Phosphoramidit-Dimere **144Rp** und **144Sp**

6.4.2 ³¹P- ¹H-NMR-Spektren der P(V)-Verbindungen

Alle dargestellten Dimere wurden mittels ¹H- und ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie ESI-Massenspektrometrie charakterisiert. Als Beispiel ist in Abbildung 6.27 das ³¹P-NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten, 3-phenylpropylmodifizierten Dimers **142Sp** dargestellt. In Abbildung 6.28 ist das entsprechende ¹H-NMR-Spektrum abgebildet. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch ¹H,¹H-COSY-NMR-Messungen. Das Spektrum für die Substanz **142Sp** ist im Anhang wiedergegeben.

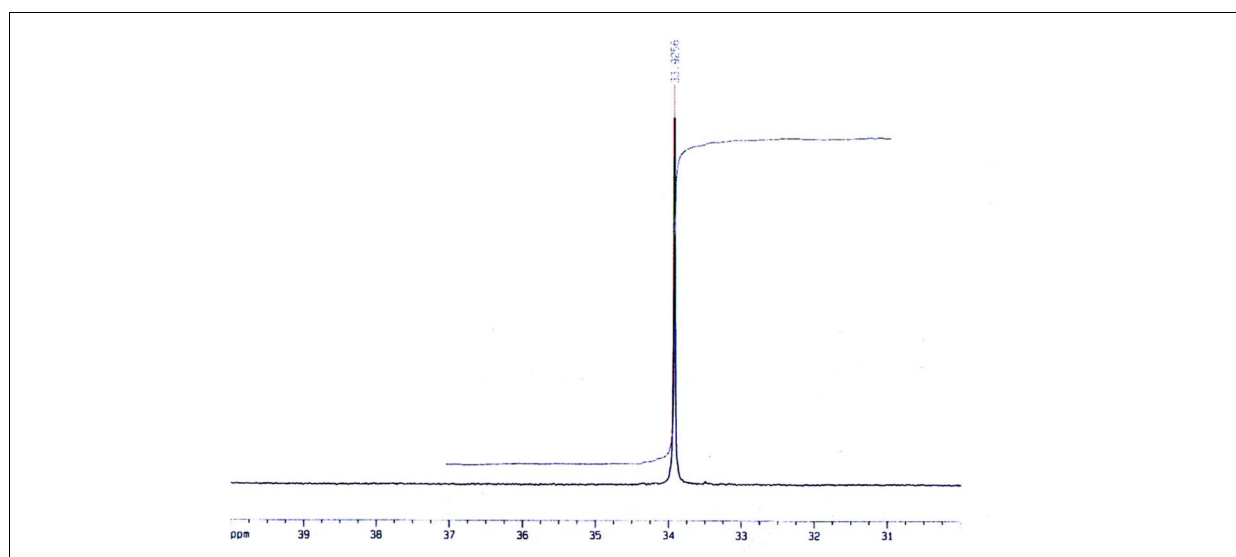


Abb. 6.27 ³¹P-NMR-Spektrum des isomerenreinen 3-phenylpropylmodifizierten Dimers **142Sp**

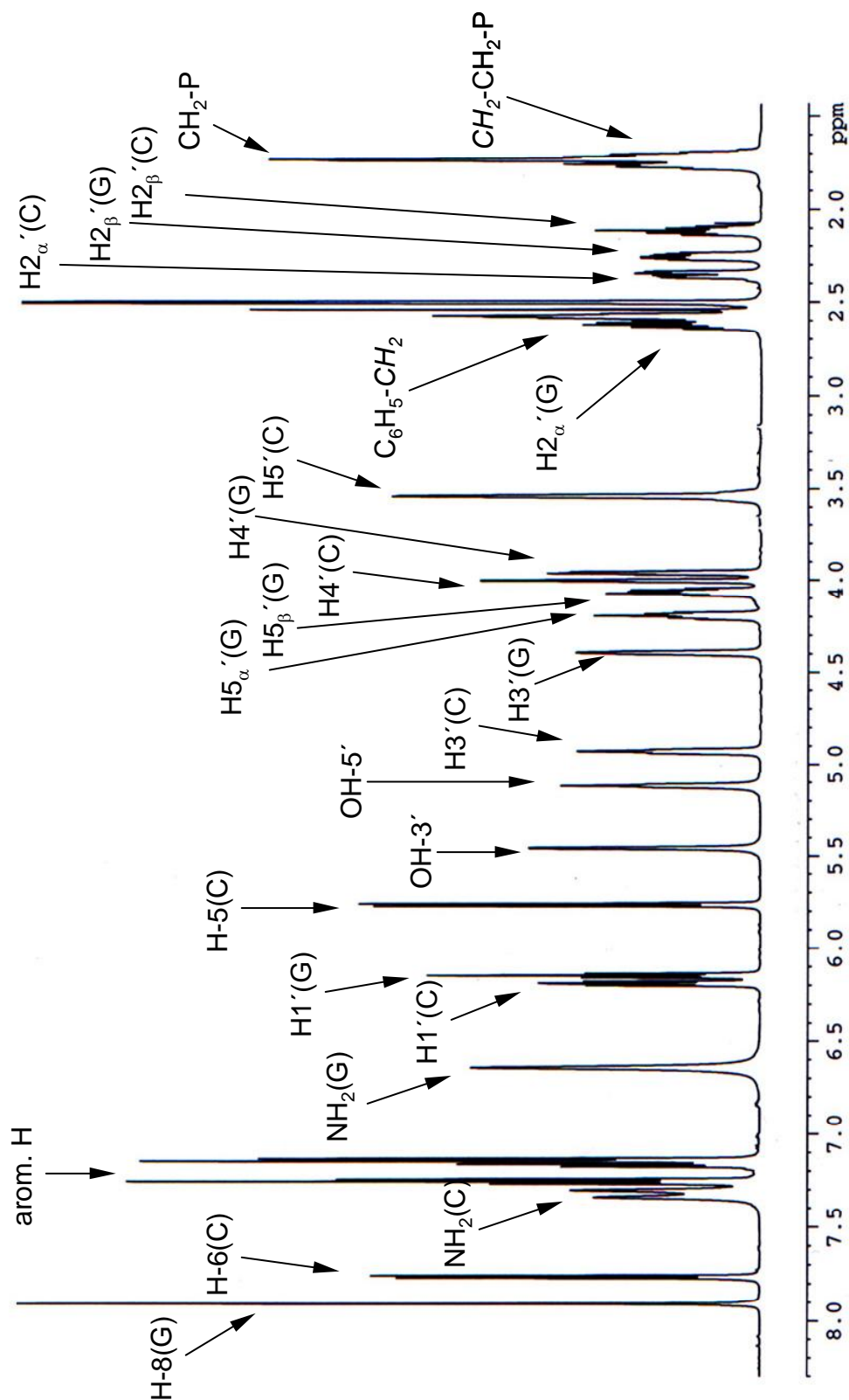


Abb. 6.28 ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, (d_6) -DMSO) des isomerenreinen 3-phenylpropyl-modifizierten Dimers **142Sp**

7 Oligonucleotid-Synthese

7.1 Synthetisierte Oligonucleotide

Alle während dieser Arbeit synthetisierten DNA- und RNA-Oligonucleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode im 1,0 μmol Maßstab an einem PerSeptive Biosystems Synthesizer hergestellt. Der eingesetzte Synthesesyklus ist in Kapitel 1 erläutert und in Abb. 1.5 abgebildet. Es wurden vorgefertigte Säulen mit CPG-Trägermaterial, die das erste Nucleosid tragen, eingesetzt. Für die Darstellung unmodifizierter Oligonucleotide wurden die modellspezifischen Syntheseprotokolle übernommen. Bei der Synthese modifizierter DNA-Oligonucleotide wurde die Kupplungszeit der Amidite von 30s auf 300s verlängert. Alle DNA-Oligonucleotidsynthesen endeten ohne Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe (DMTr-on), während bei der Darstellung von RNA-Strängen die Schutzgruppe entfernt wurde (DMTr-off). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die modifizierten Nucleotide, die in die DNA-Oligonucleotide eingebaut wurden, mit den in Abbildung 7.1 aufgeführten Abkürzungen versehen. Der dick hervorgehobene Buchstabe gibt Auskunft über die Modifikation, während der hochgestellte Buchstabe für das jeweilige modifizierte Nucleosid (A, G, C, T) steht.

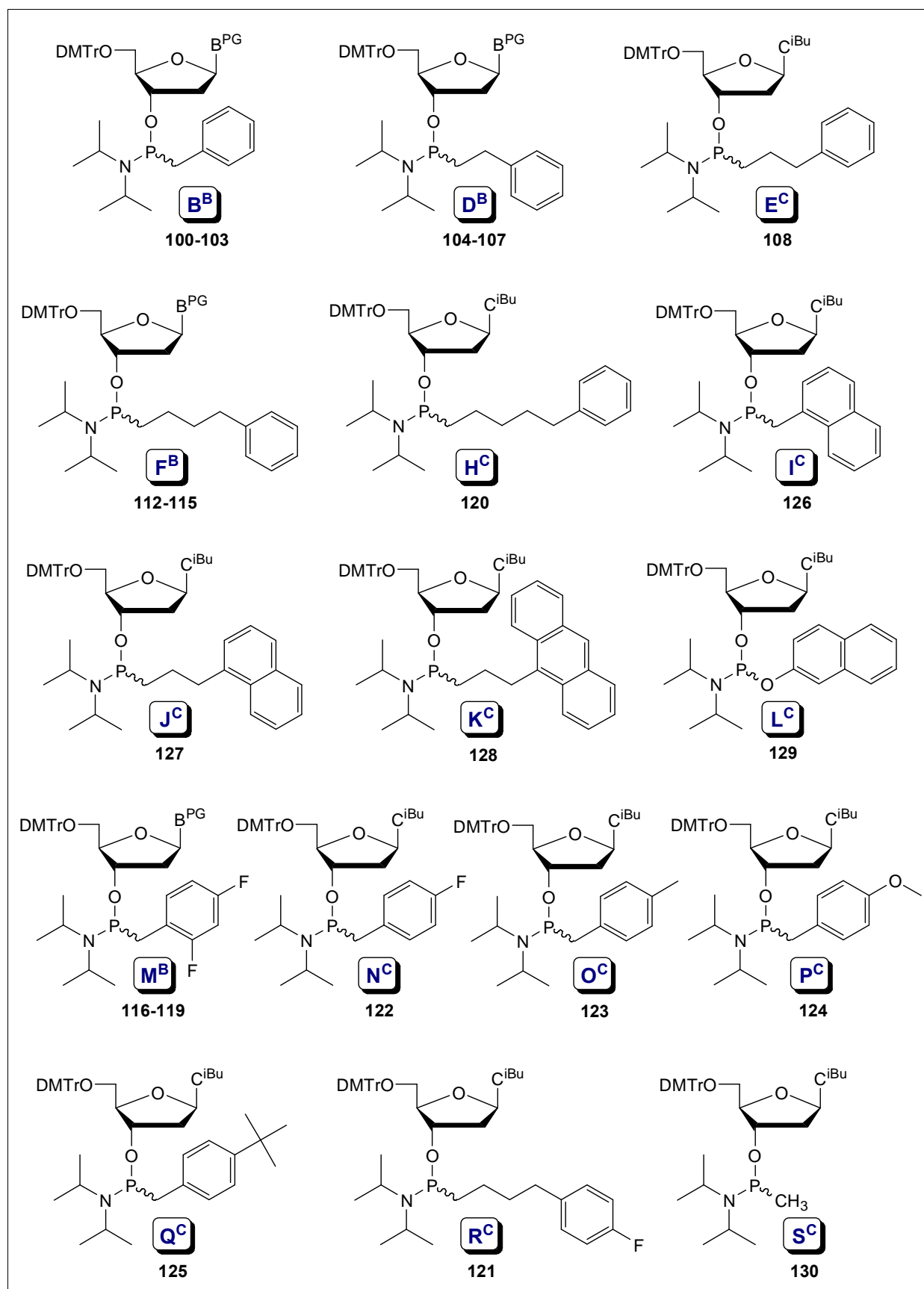


Abb. 7.1 Übersicht der in Oligonucleotide eingebauten Phosphoramidit-Bausteine

So handelt es sich z.B. bei der Kombination **H^C** um ein 5-phenylpentylmodifiziertes 2'-Desoxycytidin-Phosphoramidit, welches in das Oligonucleotid eingebaut wurde. Für die bessere Orientierung wurde(n) die Modifikationsstelle(n) in jeder Sequenz zusätzlich mit einem Punkt gekennzeichnet. In den Tabellen 7.1-7.3 sind alle Sequenzen der synthetisierten Oligonucleotide **S01-S61** aufgeführt. Bei den Strängen **S01-S19** handelt es sich um nicht-selbstkomplementäre einfach modifizierte Hexamere (Tab. 7.1). Die Modifikationsstelle sitzt jeweils in der Mitte des Oligonucleotids. Im Falle der Dodecamere **S20-S39** wurde die Modifikationsstelle innerhalb des Oligomers variiert.

Tab. 7.1 Oligonucleotide ohne oder mit einfachem Einbau modifizierter Nucleotide

CG-Hexamere		Dodecamere	
S01	5'-d(GCC GCG)	S20	5'-d(CAG GTC AAT CAT)
S02	5'-d(CGC GGC)	S21	5'-d(ATG ATT GAC CTG)
S03	5'-d(GCB ^C •GCG)	S22	5'-d(CAG GTB ^C •AAT CAT)
S04	5'-d(GCD ^C •GCG)	S23	5'-d(CAG GTC AAT B ^C •AT)
S05	5'-d(GCE ^C •GCG)	S24	5'-d(B ^C •AG GTC AAT CAT)
S06	5'-d(GCF ^C •GCG)	S25	5'-d(CAG GTM ^C •AAT CAT)
S07	5'-d(GCH ^C •GCG)	S26	5'-d(CAG GTC AAT M ^C •AT)
S08	5'-d(GCI ^C •GCG)	S27	5'-d(M ^C •AG GTC AAT CAT)
S09	5'-d(GCJ ^C •GCG)	S28	5'-d(CAG GTE ^C •AAT CAT)
S10	5'-d(GCK ^C •GCG)	S29	5'-d(CAG GTC AAT E ^C •AT)
S11	5'-d(GCL ^C •GCG)	S30	5'-d(E ^C •AG GTC AAT CAT)
S12	5'-d(GCM ^C •GCG)	S31	5'-d(CAG GTI ^C •AAT CAT)
S12/1	5'-d(GC144RpCG)	S32	5'-d(CAG GTC AAT I ^C •AT)
S12/2	5'-d(GC144SpCG)	S33	5'-d(I ^C •AG GTC AAT CAT)
S13	5'-d(GCN ^C •GCG)	S34	5'-d(CAG GTJ ^C •AAT CAT)
S14	5'-d(GCO ^C •GCG)	S35	5'-d(CAG GTC AAT J ^C •AT)
S15	5'-d(GCP ^C •GCG)	S36	5'-d(J ^C •AG GTC AAT CAT)
S16	5'-d(GCQ ^C •GCG)	S37	5'-d(CAG GTK ^C •AAT CAT)
S17	5'-d(GCR ^C •GCG)	S38	5'-d(CAG GTC AAT K ^C •AT)
S18	5'-d(GCS ^C •GCG)	S39	5'-d(K ^C •AG GTC AAT CAT)
S19	5'-d(GCCp _s GCG)		

Dabei wurden jeweils die mittlere-, die vorletzte- (3'-Ende) oder die letzte- (5'-Ende) Phosphatgruppe modifiziert. Bei den Oligonucleotiden **S19** (Tab. 7.1) und **S57** (Tab. 7.3) wurden Phosphorthioate als Modifikationen eingebaut. Die Position der Modifikation innerhalb der Sequenz ist mit **p_s** gekennzeichnet. Die Synthese dieser Oligomere erfolgte routinemäßig nach der Phosphoramiditmethode. Für die zu modifizierende Phosphateinheit wurde für die Oxidation und gleichzeitige Schwefelung das Beaucages-Reagenz eingesetzt (siehe Kap. 3.2). Bei den Oligonucleotiden **S12/1** und **S12/2** wurden die in Lösung synthetisierten diastereoisomerenreinen Phosphoramidit-Dimere **144Rp** und **144Sp** (Kap. 6.2.4) eingebaut. Analog wurde bei den Oligonucleotiden **S43/1** und **S43/2** verfahren. Dort kamen die Phosphoramidit-Dimere **140Rp** und **140Sp** zum Einsatz.

Bei den Sequenzen **S40-S44** handelt es sich um selbstkomplementäre CG-Hexamere die jeweils an der mittleren Position modifiziert wurden (Tab. 7.2). Die Oligonucleotide **S45-S49** wurden so gewählt, dass diese nach der Hybridisierung mit dem Gegenstrang eine Ausbuchtung ergeben.

Tab. 7.2 Synthetisierte selbstkomplementäre CG-Hexamere **S40-S44** und DNA-Oligonucleotide die nach der Hybridisierung eine Ausbuchtung ergeben **S45-S49**.

Selbstkomplementäre CG-Hexamere		Stränge mit Ausbuchtungen (engl.: <i>bulges</i>)	
S40	5'-d(CGC GCG)	S45	5'-d(CGT CAC GAC AT)
S41	5'-d(CGB ^C •GCG)	S46	5'-d(ATG TCG GAC G)
S42	5'-d(CGD ^C •GCG)	S47	5'-d(CGT CAH ^C •GAC AT)
S43	5'-d(CGE ^C •GCG)	S48	5'-d(CGT CCG ACA T)
S43/1	5'-d(CG 140Rp CG)	S49	5'-d(CGT CH ^C •G ACA T)
S43/2	5'-d(CG 140Sp CG)		
S44	5'-d(CGH ^C •GCG)		

Bei den Sequenzen **S50-S57** handelt es sich um 17mer Oligonucleotide, die bei den Antisense-Untersuchungen zum Einsatz kamen, während die RNA-Stränge **S59-S61** den RNAi-Versuchen dienten. Im Falle der Stränge **S53-S57** wurden jeweils die drei terminalen Phosphordiesterbrücken modifiziert. Auf die Hintergründe für die Auswahl der jeweiligen Sequenzen wird in den folgenden Kapiteln noch näher eingegangen.

Tab. 7.3 Oligonucleotide für die Antisense-Untersuchungen **S50-S58**, Oligonucleotide für die RNAi-Untersuchungen **S59-S61**.

Antisense- und RNAi-Oligonucleotide	
S50	5'-d(TGG TGC ACG GTC TAC GA)
S51	5'-d(TCG TAG ACC GTG CAC CA)
S52	5'-r(UCG UAG ACC GUG CAC CA)
S53	5'-d(B^T•B^G•B^G•TGC ACG GTC TB^A•B^C•B^G•A)
S54	5'-d(D^T•D^G•D^G•TGC ACG GTC TD^A•D^C•D^G•A)
S55	5'-d(F^T•F^G•F^G•TGC ACG GTC TF^A•F^C•F^G•A)
S56	5'-d(M^T•M^G•M^G•TGC ACG GTC TM^A•M^C•M^G•A)
S57	5'-d(Tp _s Gp _s Gp _s TGC ACG GTC TAp _s Cp _s Gp _s A)
S58	5'-r(GAG GUC UCG UAG ACC GUG CAC CAU GAG CAC)
S59	5'-r(CUC AUG GUG CAC GGU CUA CGA TT)
S60	5'-r(UCG UAG ACC GUG CAC CAU GAG TT)
S61	5'-r(CUG AUG CUG CAC CGU GUA CGA TT)

Die Effizienz der Kupplung wurde mittels eines im Oligonucleotid-Syntesizer integrierten Trityl-Monitors verfolgt. Dabei wird nach jedem Zyklus die Abspaltung der 4,4'-Dimethoxytritylgruppe photometrisch bei 498 nm nach einer definierten Zeiteinheit quantifiziert. Die Kupplungsausbeuten der modifizierten Phosphoramidite lagen über 98% und sind mit den Standardamiditen vergleichbar. Lediglich im Falle des (anthracen-9-yl)propylmodifizierten Phosphoramidits **K^C** betrug die Kupplungsausbeute 95%. In Abbildung 7.2 sind exemplarisch die Daten der Tritylabspaltung anhand eines monomodifizierten Dodecamers **S34** und eines sechsfach modifizierten 17mer Antisense-Oligonucleotids **S54** graphisch dargestellt. Die terminale 4,4'-Dimethoxytritylgruppe wurde bei diesen Synthesen nicht abgespalten. Unter den Balken ist jeweils das Nucleotid angegeben, von welchem die Tritylgruppe abgespalten wurde. Bei den mit Zahlen gekennzeichneten Balken (5-9) handelt es sich um die modifizierten Bausteine. Im Falle der unmodifizierten und modifizierten Guanotin-Phosphoramidite kommt es aufgrund der langsameren Abspaltungsgeschwindigkeit der Schutzgruppe zu einer Verfälschung der Bestimmung des Wertes der Kupplungsausbeute. Dies erklärt auch den erneuten Anstieg der Tritylausbeute nach der Ankupplung eines weiteren Nucleotids an Guanotin.

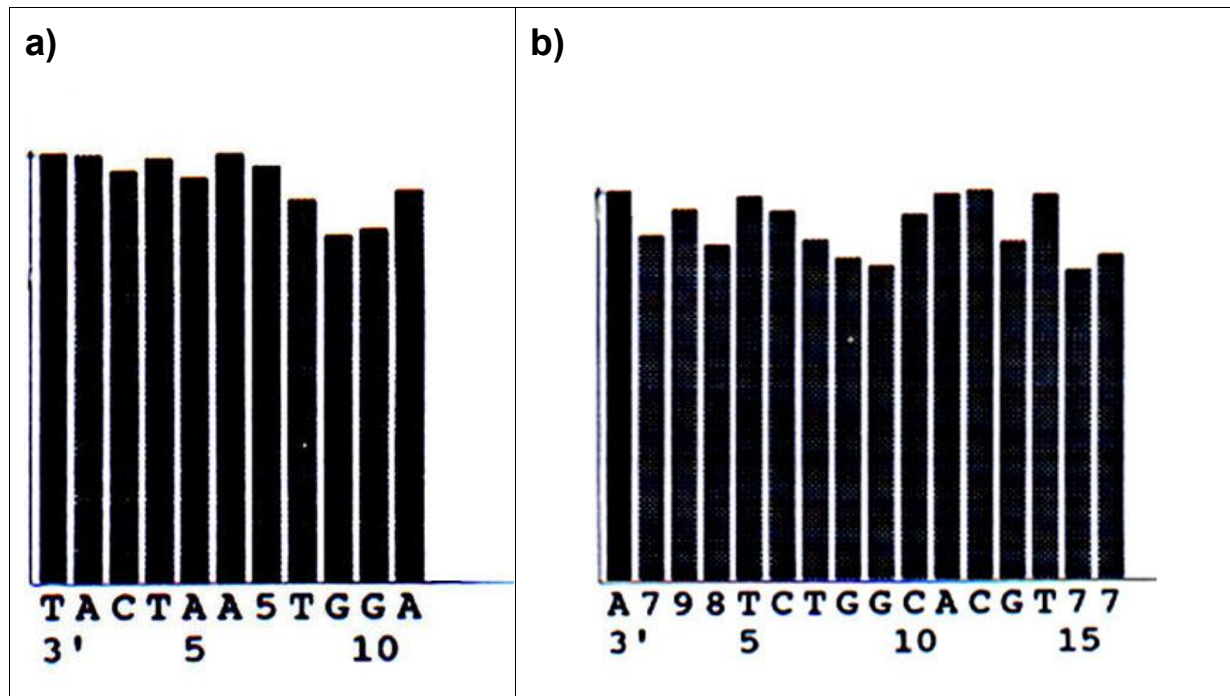


Abb. 7.2 Bestimmung der Kupplungsausbeute durch photometrische Messung der Dimethoxytritylabspaltung in 3'→5'-Richtung; a) einfach 3-(naphth-1-yl)propyl modifiziertes Dodecamer **S34**, 5'-d(CAG GTJ^C•AAT CAT) und b) sechsfach 2-phenylethylmodifiziertes 17mer Antisense-Oligonucleotid **S54**, 5'-d(D^T•D^G•D^G•TGC ACG GTC TD^A•D^C•D^G•A).

7.2 Aufreinigung / Diastereoisomerentrennung

Aufreinigung

Die Aufreinigung der unmodifizierten RNA-Oligonucleotide **S52** und **S58-S61** wurde nach Standardbedingungen durchgeführt. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 12.2.2 erläutert. Im Falle von unmodifizierten DNA-Oligonucleotiden wurden die Schutzgruppen mit konzentriertem Ammoniak bei 60°C innerhalb von 3 Stunden abgespalten. Die meisten modifizierten Oligonucleotide wurden ebenfalls mittels konz. Ammoniak entschützt. Die Abspaltung erfolgte dabei jedoch bei Raumtemperatur innerhalb von 24 Stunden. Die mit basenlabileren Modifikationen versehenen Oligonucleotide wurden nach einer Methode von Hogrefe entschützt (Hogrefe, 1993). Dabei wurden die Oligonucleotide mit einer Mischung aus Ethylendiamin/Acetonitril/Ethanol/Wasser (EDA-Mix) im Verhältnis 50:24:24:2 versetzt. Nach dreistündiger Inkubation unter Lichtausschluss war die

Abspaltung beendet und die Lösung wurde durch langsame Zugabe von 40%iger Essigsäure bei 0°C neutralisiert. Mittels dieser Variante wurden die methyl-, 1-methylnaphthyl- und 2,4-difluorbenzylmodifizierten Oligonucleotide entschützt. Der erste Aufreinigungsschritt der Oligonucleotide erfolgte in allen Fällen mittels semipräparativer RP-HPLC über eine DMTr-spezifische POROS-R3-Säule. Die filtrierten ammoniakalischen Lösungen, wie auch die neutralisierten EDA-Gemische konnten direkt auf die Säule aufgegeben werden. Mit Ausnahme der 17mer Antisense-Oligonucleotide **S53-S57** erfolgte die Trennung innerhalb von 10 Minuten. Während dieser Zeit wurde ein Gradient von 0-40% Acetonitril in 0,1M TEAA-Puffer (pH 7,0) durchlaufen. Die Flussrate betrug 5ml/min. Für die Oligomere **S53-S57** wurde ein Gradient von 0-60% Acetonitril in TEAA-Puffer (pH 7,0) gewählt. Abbildung 7.3 zeigt ein typisches RP-HPLC-Chromatogramm eines DMTr-on synthetisierten, einfach modifizierten Oligonucleotids. Dabei ist sehr gut die Retardierung des Produkts zu erkennen, während die Fehlsequenzen ohne Dimethoxytritylgruppe signifikant rascher eluieren.

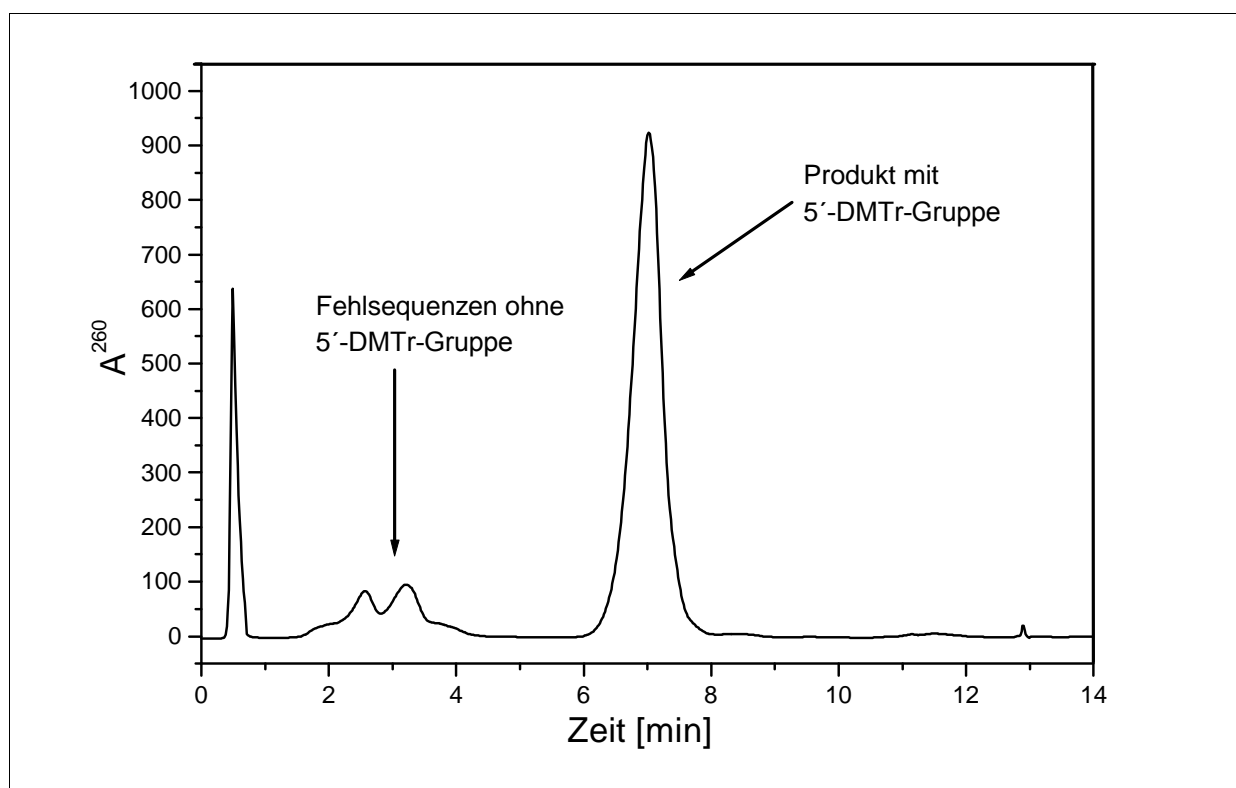


Abb. 7.3 RP-HPLC-Chromatogramm des einfach 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Hexamers 5'-d(GCK^C•GCG) **S10**; Aufreinigung über eine DMTr-spezifische POROS-R3-Säule.

Im Falle der modifizierten Antisense-Oligonucleotide **S53-56** kam es aufgrund der basischen Abspaltungsbedingungen zur teilweisen Spaltung der phenylalkylmodifizierten

Phosphatbrücken. In Abbildung 7.4 wird dies durch die höhere Intensität der Abbruchsequenzen bei einer Retentionszeit von ca. 6 Minuten widerspiegelt.

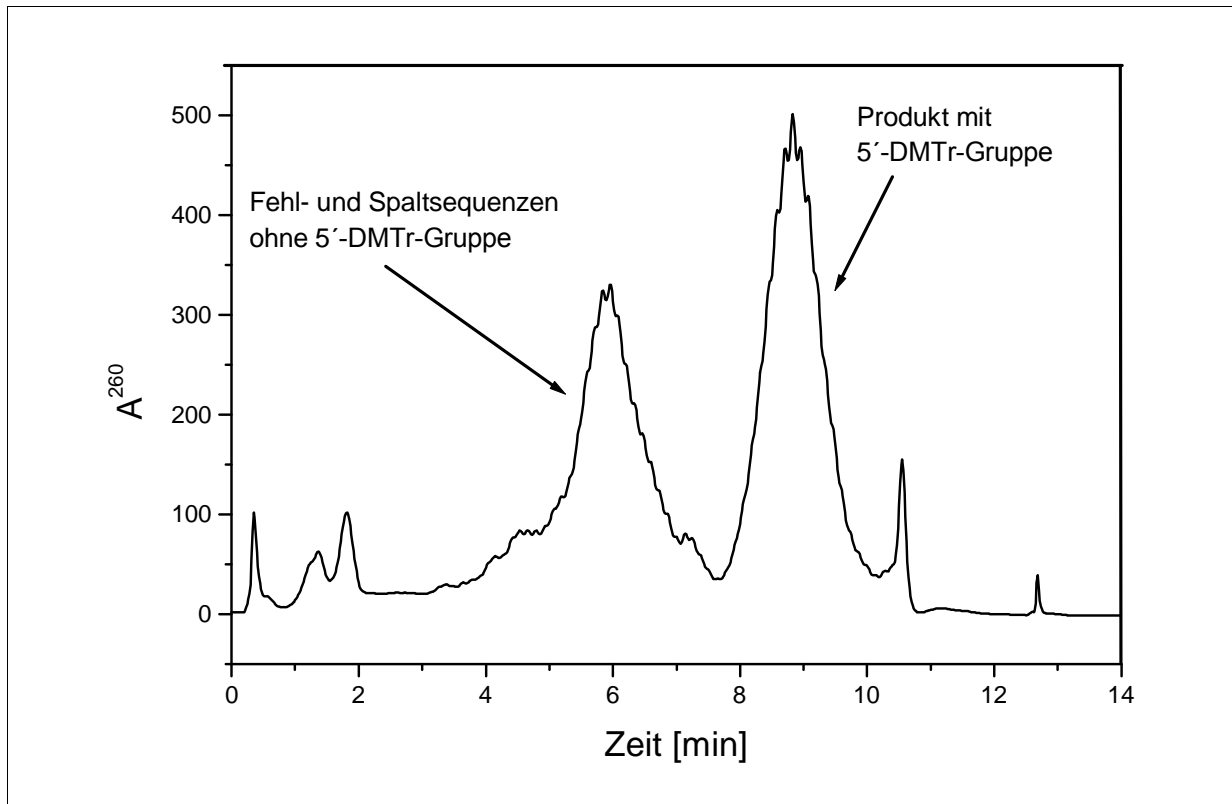


Abb. 7.4 RP-HPLC-Chromatogramm des sechsfach 2-phenylethylmodifizierten Antisense-Oligonucleotids 5'-d(**D**^T•**D**^G•**D**^G•TGC ACG GTC TD^A•**D**^C•**D**^G•A) **S54**; Aufreinigung über eine DMTr-spezifische POROS-R3-Säule.

Die aufgereinigten Oligonucleotide wurden nach Entfernung der Lösungsmittel mit 80%iger Essigsäure versetzt. Nach jeweils 30 Minuten war die 4,4'-Dimethoxytritylgruppe vollständig abgespalten und die Essigsäure wurde mittels einer SpeedVac Anlage entfernt. Die Oligonucleotide wurden in 1,0 M Natriumchloridlösung aufgenommen und durch Zugabe von Ethanol innerhalb von 2 Stunden bei –80°C gefällt. Alle unmodifizierten Oligonucleotide konnten nach dieser Aufarbeitung sofort für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. Die Antisense-Oligonucleotide **S53-S56** mussten nochmals gereinigt werden, da die durch die basische Behandlung entstandenen 3'-Abbruchsequenzen n-1, n-2 und n-3 nicht über die POROS-Säule abgetrennt werden konnten. Die Oligonucleotide wurden dafür auf eine LiChrospher RP-18 Säule injiziert. Für die Trennung wurde ein Gradient von 0-60% Acetonitril in TEAA-Puffer (pH 7,0) innerhalb von 30 Minuten verwendet.

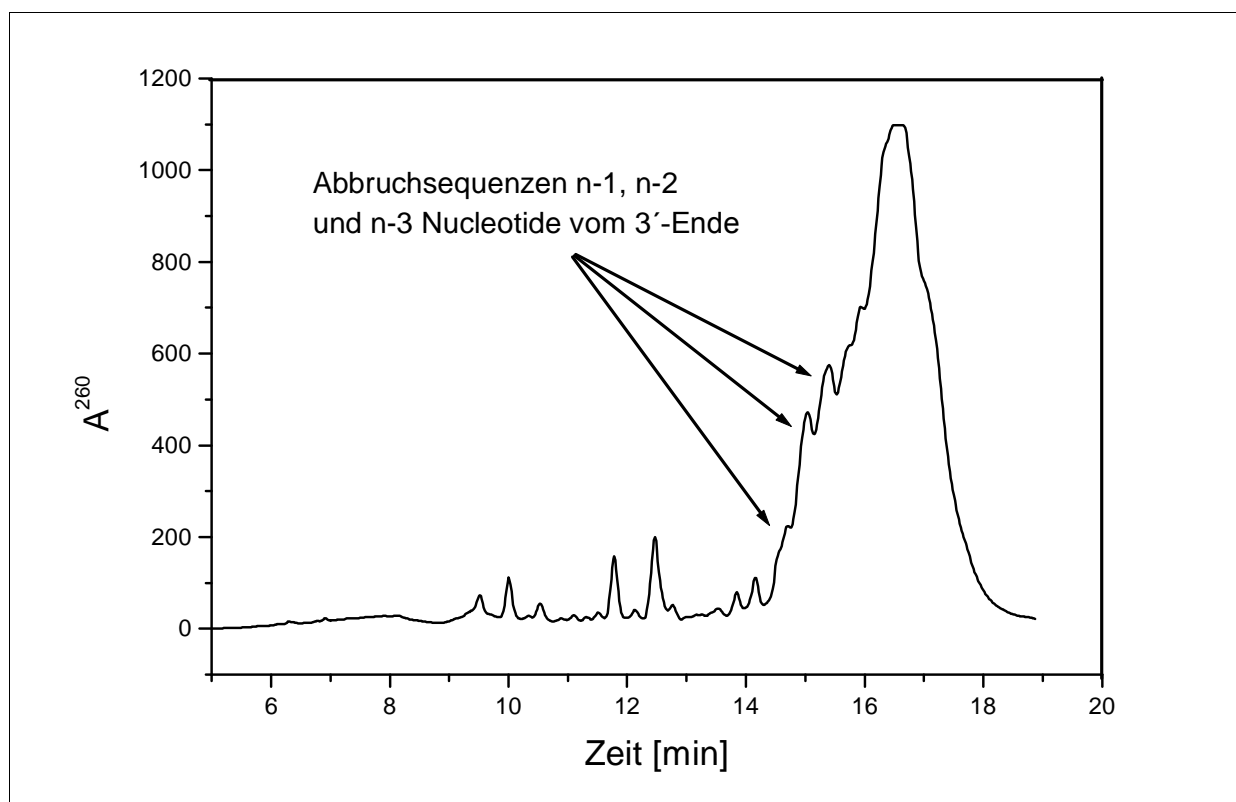


Abb. 7.5 RP-HPLC-Chromatogramm des Antisense-Oligonucleotids **S54** nach Abspaltung der terminalen DMTr-Gruppe; Aufreinigung über eine LiChrospher RP-18-Säule.

Diastereoisomerentrennung

Die Trennung von Diastereoisomeren mittels RP-HPLC ist bereits für Benzyl-, Methylphosphonate und Phosphorthioate beschrieben (Lehmann, 2001; Lehmann, 1999; Schwarzer, 1997). Aufgrund der Ausbildung von 2^n Diastereoisomeren bei n-fachem Einbau von Rückgratmodifikationen lassen sich nur einfach modifizierte Oligonucleotide gut und effektiv trennen. Oligonucleotide mit mehreren, jedoch nicht direkt aufeinanderfolgenden, diastereoisomerenreinen Alkylphosphonatzentren können über die Block-Kupplungsstrategie aufgebaut werden (Löschner, 1990). Über diese Methode wurden in der vorliegenden Arbeit zwei einfach modifizierte Oligonucleotide dargestellt. Zum einen das 2,4-difluorbenzylmodifizierte Hexamer **S12** und zum anderen das 3-phenylpropylmodifizierte, selbstkomplementäre Hexamer **S43**. Ersteres wurde mittels der Block-Strategie eingebaut, da die RP-HPLC-Trennung der diastereoisomeren Hexamere nicht möglich war. Im zweiten Fall stellte sich heraus, dass die Isomerentrennung bei einfach modifizierten, selbstkomplementären Oligonucleotiden nur in kleinen Mengen durchzuführen ist. Da die Isomeren **S43Rp** und **S43Sp** in folgenden Arbeiten mittels NMR untersucht werden sollen und dafür größere Substanzmengen vonnöten sind, wurde auf die Block-Strategie zurückgegriffen.

Die Trennung der übrigen Diastereomerenpaare der synthetisierten Hexamere und Dodecamere gelang mittels RP-HPLC an einer Purospher® Star RP-18e-Säule („endcapped“) (5µm). Es wurde jeweils bei einer Flussrate von 1,0 ml/min mit einem Gradienten aus 0,1M TEAA-Puffer (pH 7,0) und Acetonitril gearbeitet. Abbildung 7.6 zeigt exemplarisch das HPLC-Chromatogramm einer Isomerentrennung. Der Gradient variierte dabei stark in Abhängigkeit der Art und der Position der Modifikation im Oligonucleotid. So konnten am 5'-Ende modifizierte Isomerenpaare leichter als mittig modifizierte getrennt werden. Diese wiederum konnten einfacher getrennt werden als Oligonucleotide mit Modifikationen an der vorletzten Phosphatbrücke. In allen Fällen konnte jedoch nahezu eine Basislinientrennung erzielt werden. Die eingesetzten Gradienten sind in Kapitel 12.2.2 tabellarisch aufgeführt.

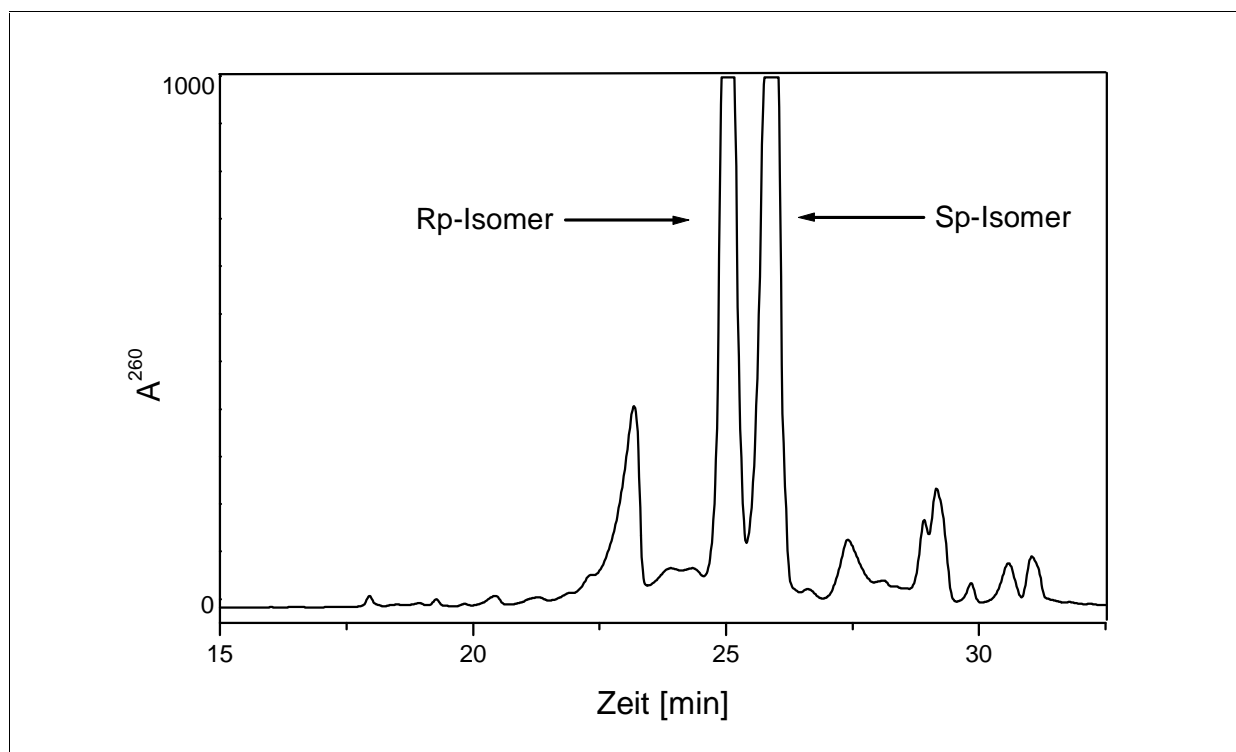


Abb. 7.6 RP-HPLC-Chromatogramm der Diastereoisomerentrennung des 3-(naphth-1-yl)propylmodifizierten Dodecamers **S34**.

Dem rascher eluierenden Isomer wurde die Rp-Konfiguration, dem langsamer eluierenden Isomer die Sp-Konfiguration zugeordnet. (Smith, 1997, Lebedev, 1993, Löschner, 1990) Dies geschah in Analogie zu den literaturbekannten Methylphosphonaten und Phosphorthioaten. Auf die Zuordnung der Konfiguration wird in Kapitel 9 noch näher eingegangen.

7.3 Charakterisierung der Oligonucleotide

Die durchgeführten Oligonucleotid-Synthesen konnten durch Messung der Molekülmassen der erhaltenen Oligonucleotide auf ihren Erfolg hin kontrolliert werden. Die Retentionszeiten der RP-HPLC-Aufreinigung ergeben in der Regel schon einen Hinweis auf die korrekte Synthese, aber nicht den endgültigen Beweis über die richtige Länge des Oligonucleotids. Für die Massenbestimmungen standen zwei Methoden zur Verfügung. Dies waren die Electrospray-Ionisation- (ESI) und die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation Massenspektrometrie (matrix-assited laser desorption/ionisation, MALDI) welches mit einem Flugzeitmassenspektrometer (time of flight, TOF) gekoppelt war. Beide Methoden ermöglichen die unfragmentierte Analyse von Oligonucleotiden mit hoher Empfindlichkeit. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit gegenüber Salzen wurden die Oligonucleotide ausschließlich mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht (Fitzgerald, 1995, Bahr, 1994).

In den Abbildungen 7.7 und 7.8 sind beispielhaft zwei MALDI-TOF-Massenspektren abgebildet. Abbildung 7.7 zeigt das Spektrum des einfach 3-(naphth-1-yl)propyl-modifizierten Dodecamers **S35Sp**. Die gefundene Masse stimmt sehr gut mit der berechneten überein. Bei den weiteren Signalen handelt es sich um das doppelt geladene Ion $[M-2H]^{2-}$ beziehungsweise um das Dimer mit einer Ladung $[2M-H]^-$. Abbildung 7.8 zeigt das MALDI-Spektrum des sechsfach modifizierten Antisense-Oligonucleotids **S54**. Alle berechneten und gefundenen Massen der Oligonucleotide sind in Kapitel 12.2.2 tabellarisch aufgeführt. Bei einigen Strängen konnte nur die Masse des Natrium- oder Ammoniumaddukts gefunden werden. Da die bestimmten Massen aber relativ genau den Addukten entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass die Oligonucleotide in der gewünschten Sequenz vorliegen.

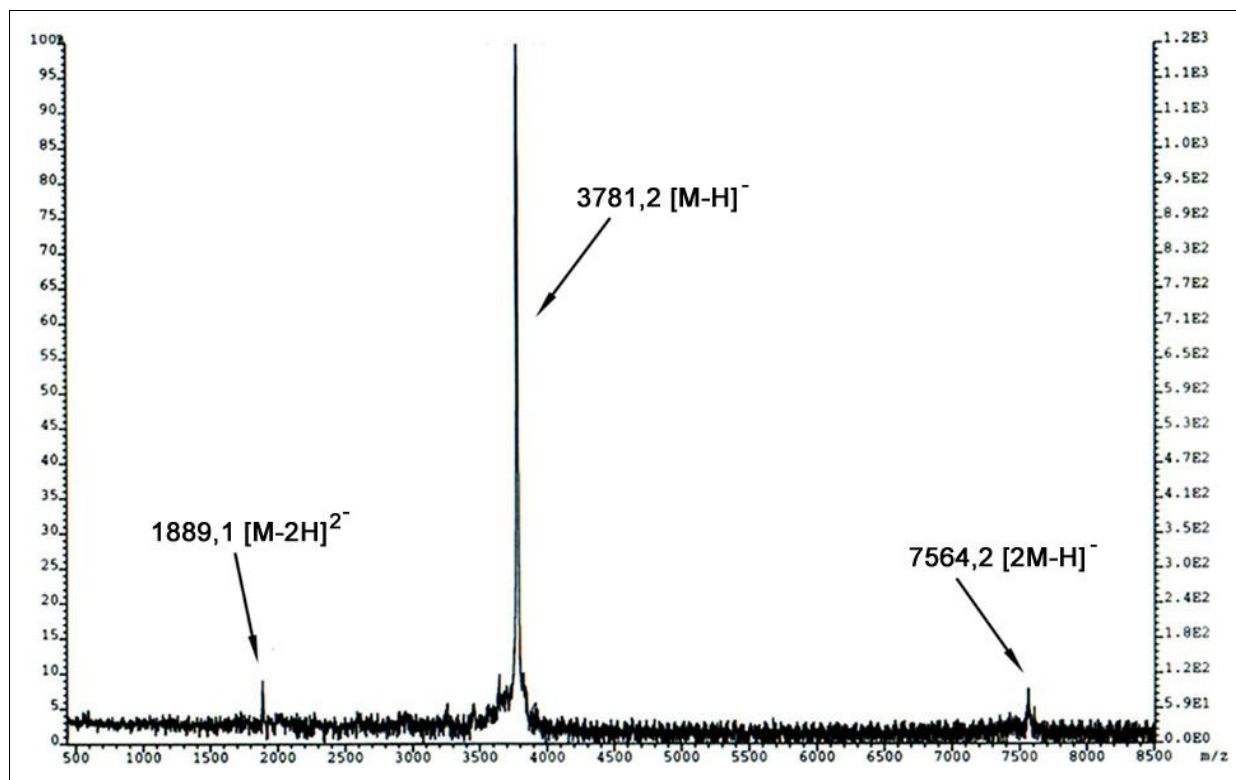


Abb. 7.7 MALDI-TOF-Spektrum des einfach 3-(naphth-1-yl)propylmodifizierten Dodecamers **S35Sp**; Berechnete Masse: 3782,7 $[M-H]^-$.

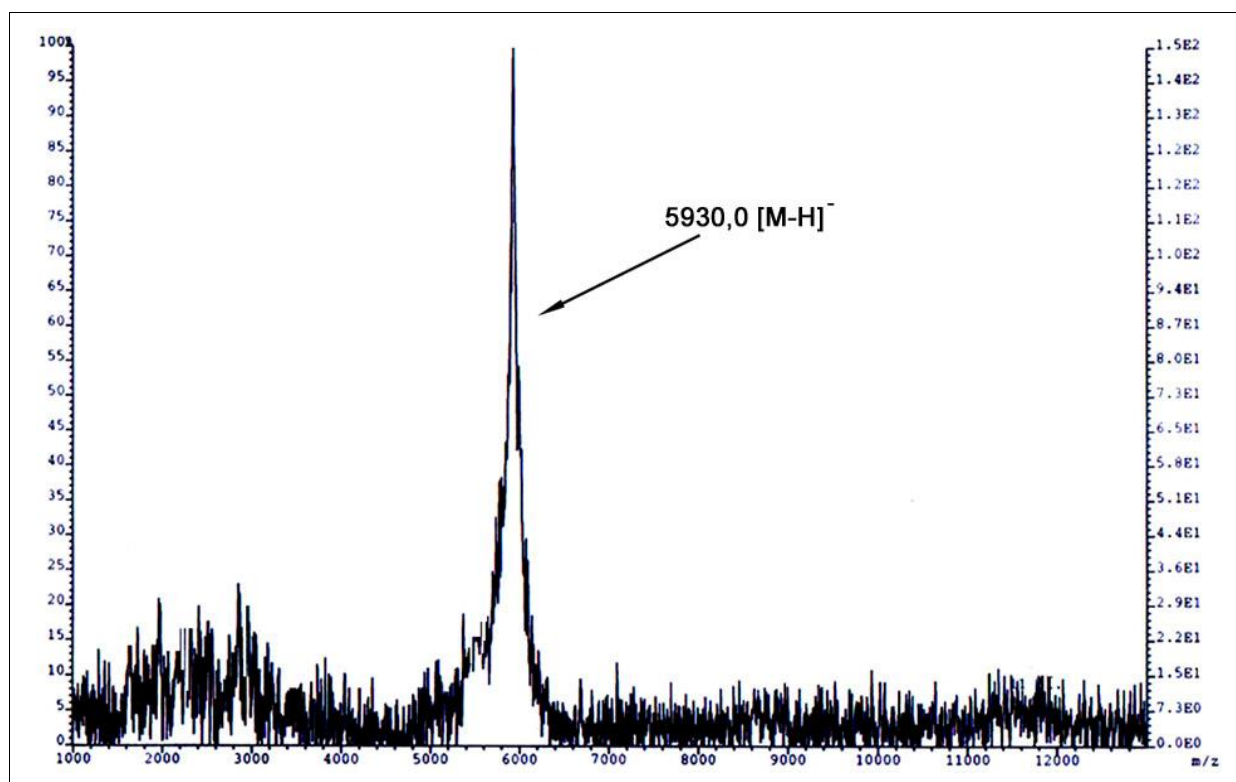


Abb. 7.8 MALDI-TOF-Spektrum des sechsfach 2-phenylpropylmodifizierten 17mer Antisense-Oligonucleotids **S54**; Berechnete Masse: 5929,8 $[M-H]^-$.

Weiterhin wurde die Reinheit sowie die vollständige Diastereoisomerentrennung mittels RP-HPLC überprüft. Dazu wurden ca. 0,2 OD auf eine analytische Purospher® Star RP-18e-Säule (5µm) injiziert und mit einem Gradienten aus 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) und Acetonitril eluiert. Diese Untersuchungen dienten ebenfalls zur Bestimmung der Lipophilie der Oligonucleotide (Kap. 8.4, Kap. 10.4). In Abbildung 7.9 ist das erhaltene HPLC-Chromatogramm des Antisense-Oligonucleotids **S54** abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die n-1, n-2 und n-3 Abbruchsequenzen vollständig abgetrennt werden konnten (vgl. Abb. 7.5).

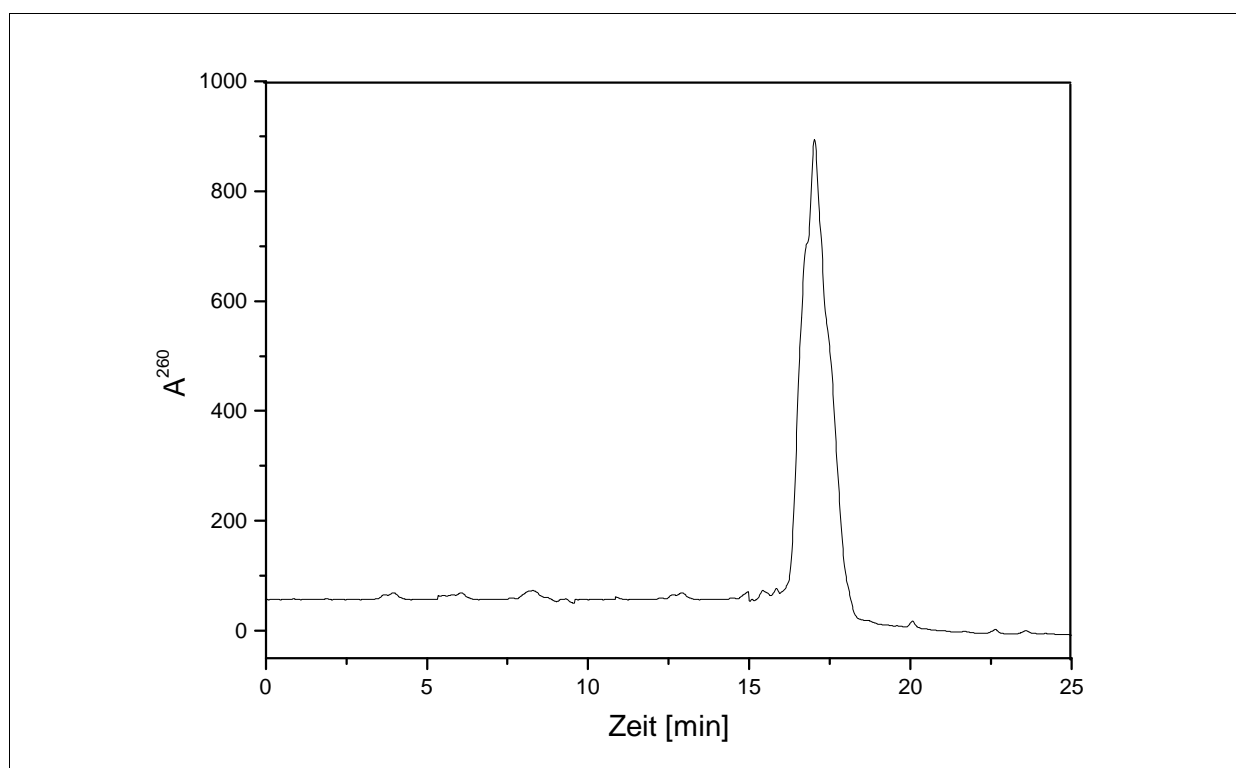


Abb. 7.9 RP-HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Antisense-Oligonucleotids **S54**.

Zur weiteren Überprüfung der Reinheit der Antisense-Oligonucleotide wurde eine analytische denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (Abb. 7.10). Für die unmodifizierten und modifizierten 17mer Antisense-Oligonucleotide hat sich die durch ein 15%iges Polyacrylamid-Gel gebildete Vernetzung als optimal herausgestellt. Als Laufpuffer wurde ein Boratpuffer (TBE) verwendet. Das Polyacrylamid-Gel wurde mittels Silberfärbung entwickelt. Es zeigt die gute Reinheit der synthetisierten Oligonucleotide. Erwartungsgemäß ist die Laufhöhe des unmodifizierten Oligomers **S50** nahezu identisch mit dem Phosphorthioat **S57**. Die 2-phenylethyl- **S45**

und 4-phenylbutylmodifizierten **S55** Oligonucleotide zeigen aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes und der geringeren Ladung eine kürzere Laufgeschwindigkeit.



Abb. 7.10 Analytisches Polyacrylamid-Gel (15% PAA) nach Silberfärbung. Aufgetragen wurden die Antisense-Oligonucleotide **S50**, **S54-S57**.

8 Eigenschaften der Oligonucleotide

8.1 Bestimmung der Duplex-Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen der Oligonucleotid-Duplexe (T_m -Werte) wurden während dieser Arbeit mit Hilfe der UV-Spektroskopie bestimmt. Unter dem Schmelzpunkt eines Duplex versteht man die Temperatur, bei der genau die Hälfte der Oligonucleotide in einer Probe als Duplexe vorliegen. Die andere Hälfte der Duplexe sind bei dieser Temperatur schon aufgeschmolzen und die Oligonucleotide liegen als Einzelstränge vor. Der Schmelzvorgang kurzer Oligonucleotid-Duplexe unterliegt dabei dem „Alles-oder-Nichts-Modell“. Bei dem Übergang von geordneter zu ungeordneter Struktur kommt es zu einer Zunahme der Extinktion, was als Hyperchromizität bezeichnet wird. Mittels der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie kann somit der T_m -Wert eines Oligonucleotid-Duplexes bestimmt werden. Der Schmelzpunkt eines Duplexes ist sowohl abhängig von der Basenzusammensetzung, der Sequenz und der Kettenlänge, als auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung (Puglisi, 1989). Eine hohe Salzkonzentration (4 M NaCl) führt zu einer deutlichen Erhöhung der Schmelztemperatur. Im

Rahmen dieser Arbeit wurden alle T_m -Werte in einem 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), der 140 mM Natriumchlorid enthielt, gemessen.

Das Ausmaß der Hyperchromizität ist sequenz- und wellenlängenabhängig. Je höher die Hyperchromizität ist, desto exakter lassen sich die T_m -Werte bestimmen. In helicalen Oligonucleotiden beträgt diese gewöhnlich 15-30%. In dieser Arbeit wurde für jeden Modell-Oligonucleotid-Duplex das Maximum der Hyperchromizität bestimmt. Dafür wurde jeweils von den unmodifizierten Duplexen zwischen 5°C und 65°C - in Schritten von 5°C - Wellenlängenscans im Bereich von 350-210 nm durchgeführt. In Abbildung 8.1 sind diese von den unmodifizierten Duplexen **S01-S02** sowie **S20-S21** dargestellt. Im Falle des aus CG-Basenpaaren bestehenden Duplex **S01-S02** liegt das Hyperchromizitäts-Maximum bei 274 nm, während der aus allen vier natürlichen Nucleosiden zusammengesetzte Duplex **S20-S21** ein Maximum von 260 nm aufweist. Aufbauend auf diese Ergebnisse wurden alle T_m -Werte der CG-Hexamere bei 274 nm bestimmt. Die Schmelzpunkte der anderen Oligonucleotid-Duplexe wurden bei 260 nm gemessen.

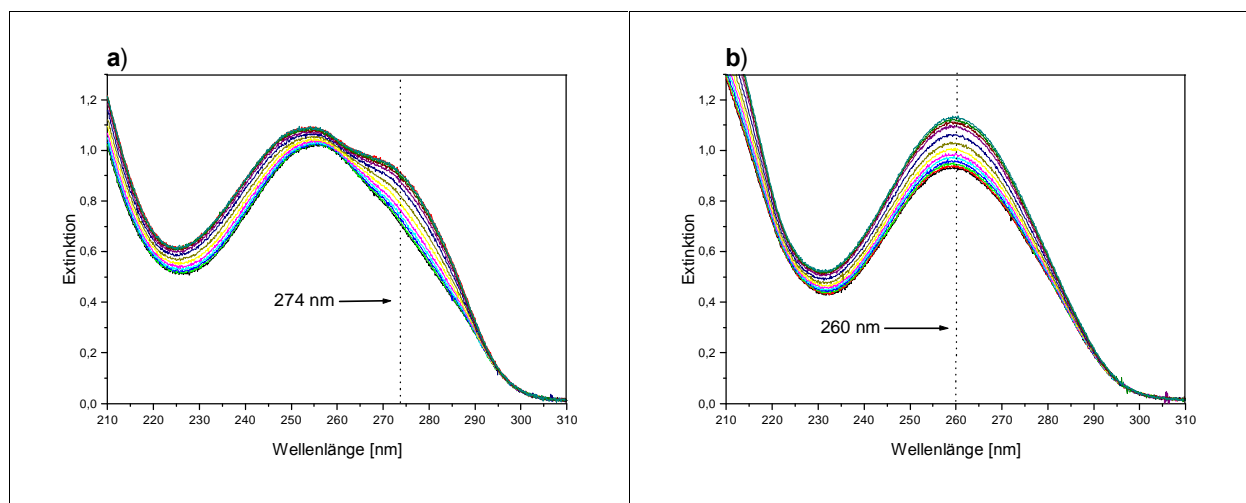


Abb. 8.1 Bestimmung der Hyperchromizitäts-Maxima, a) Hexamer-Duplexes **S01-S02**, b) Dodecamer-Duplex **S20-S21**

Die UV-Schmelzkurven wurden mittels eines Zweistrahl UV/VIS-Spektralphotometer der Firma Varian aufgenommen. Für die Messung wurde die Probenküvette mit Puffer befüllt und beide zu untersuchenden Stränge in gleicher Konzentration einpipettiert. Die Konzentration variierte in Abhängigkeit der Oligonucleotidlänge und ist im folgenden bei den Ergebnisdiskussionen angegeben. Details zur Durchführung der UV-Schmelzexperimente sind in Kapitel 12.2.4 wiedergegeben. Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte durch computerunterstützte Anpassung unter Verwendung des

Programms SigmaPlot 8.0 bzw. dessen Vorgängerversionen (Parsch, 1999; Parsch, 2001; Schweitzer, 1998). Alle Daten wurden mittels einer Doppelmessung bestimmt. Variierten die erhaltenen T_m -Werte mehr als $\pm 0,2^\circ\text{C}$ wurden weitere Messungen durchgeführt.

Im folgenden werden die erhaltenen T_m -Werte der einfach modifizierten Modell-Oligonucleotid-Duplexe diskutiert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die modifizierten Phosphatgruppen, welche sich durch den Einbau der jeweiligen Phosphoramidite ergaben (siehe Kapitel 7.1), nochmals in Abbildung 8.2 aufgeführt.

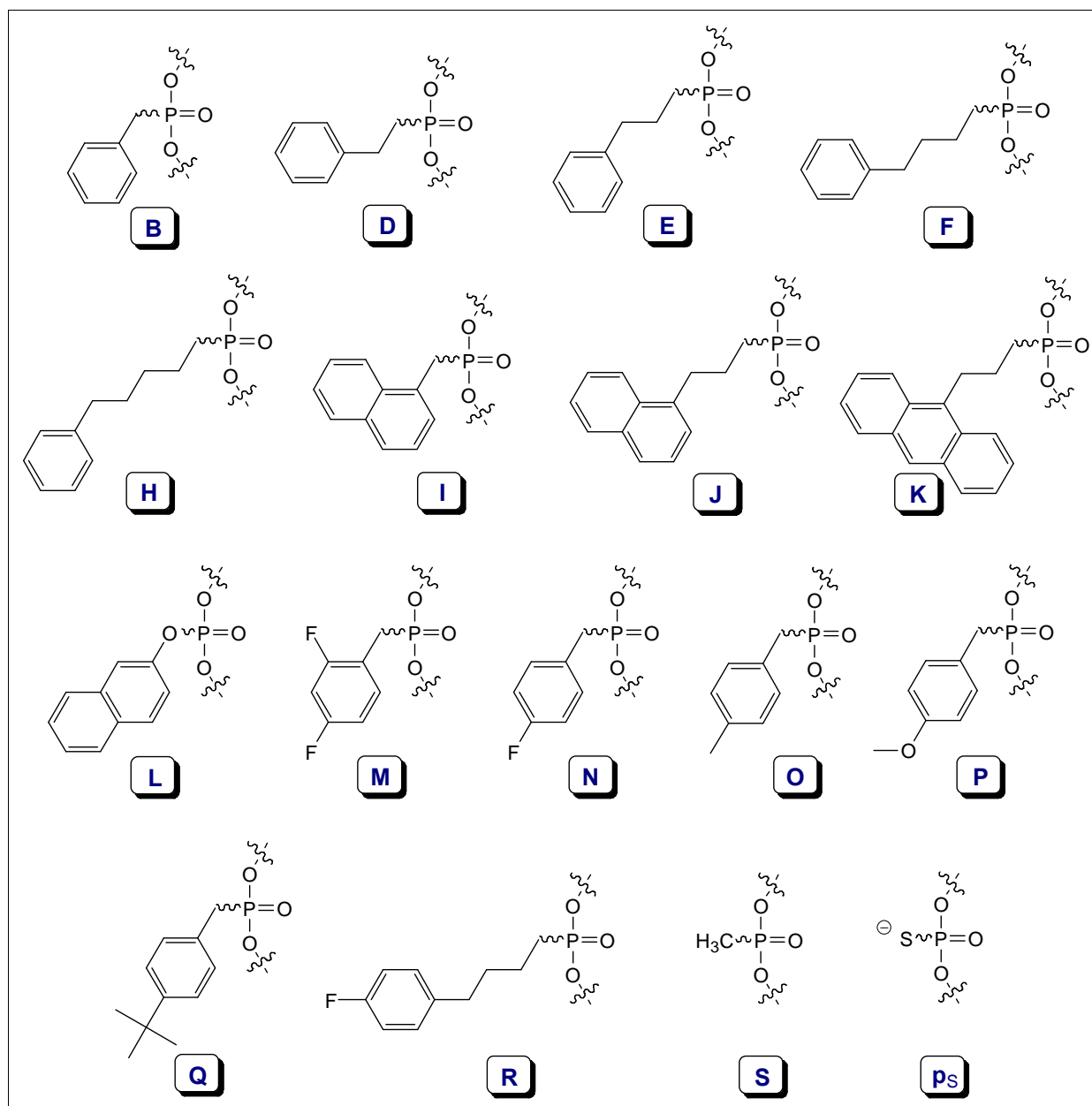


Abb. 8.2 Synthetisierte Rückgrat-Modifikationen mit den verwendeten Abkürzungen

8.1.1 T_m -Werte modifizierter Hexamere

Als erstes wurde der Duplex aus den Oligonucleotiden 5'-d(GCCGCG) **S01** und 5'-d(CGCGGC) **S02** untersucht. Alle synthetisierten Modifikationstypen wurden in die mittlere Position des Oligonucleotids 5'-d(GCC•GCG) **S01** eingebaut. Die Position der Modifikation ist in jeder Sequenz mit einem Punkt markiert (siehe Kapitel 7.1). Die erhaltenen Oligonucleotide **S03Rp** bis **S19Rp** sowie **S03Sp** bis **S19Sp** wurden mit dem Gegenstrang **S02** hybridisiert und die Schmelzkurve der Duplexe aufgenommen. Die Einzelstrangkonzentration betrug bei allen Messungen 9,0 μM , was in etwa einer optischen Dichte (OD) von 0,5, bei einer Wellenlänge von 260 nm entsprach. In allen Fällen konnte eine sigmoidale Schmelzkurve erhalten werden. In Abbildung 8.3 sind die Schmelzkurven für die Rp-konfigurierten, phenylalkylmodifizierten Duplexe dargestellt. Die modifizierten Duplexe zeigen dabei nur eine geringe, unspezifische Änderung der Hyperchromizität gegenüber dem unmodifizierten Duplex **S01-S02**.

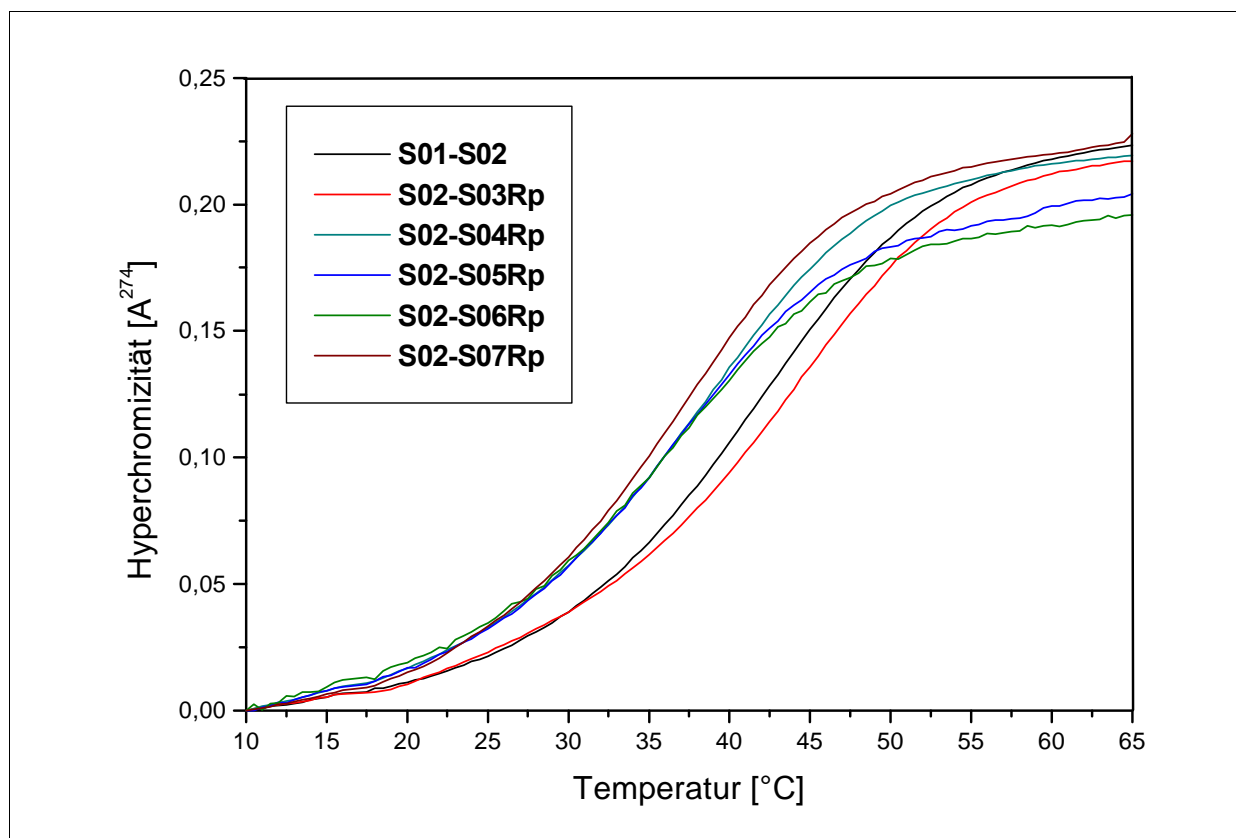


Abb. 8.3 Schmelzkurven des unmodifizierten DNA-Duplex **S01-S02** und der Rp-konfigurierten phenylalkylmodifizierten Duplexe **S02-S03Rp** bis **S07Rp**

Die aus den Schmelzkurven ermittelten T_m -Werte sind in Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2 wiedergegeben. Die Unterteilung liegt dabei in unsubstituierten (Tab. 8.1) und substituierten (Tab. 8.2) Arylalkylmodifikationen.

Für den unmodifizierten Duplex **S01-S02** wurde ein T_m -Wert von 44,3°C bestimmt. Die als Vergleichsmodifikationen synthetisierten Phosphorthioate **p_s** und Methylphosphonate **S** zeigen literaturbekannte Schmelzeigenschaften. In beiden Fällen weist der Duplex mit der Rp-konfigurierten Modifikation einen höheren T_m -Wert auf als sein Sp-Analogon. Alle vier T_m -Werte liegen jedoch unter dem des unmodifizierten Stranges **S01-S02**. Auch bei den Benzylphosphonaten **B** ist der Rp-konfigurierte Duplex stabiler als der Sp-konfigurierte Duplex. Jedoch kommt es im Falle des Duplexes **S02-S03Rp** zu einer signifikanten Erhöhung des T_m -Wertes von 1,2°C im Vergleich zum Mutterstrang. Grund hierfür dürfte eine zusätzliche attraktive Wechselwirkung zwischen dem Phenylring und dem Oligonucleotidrückgrat sein. Im weiteren Sinne kann man dabei von einer „Groove-Bindung“ sprechen.

Tab. 8.1 T_m -Werte der nicht selbstkomplementären CG-Hexamere. Gemessen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Wellenlänge von 274 nm, Einzelstrangkonzentration: 9,0 µM, Fehlergrenze: ±0,2°C.

Modifikations- typ (Abb. 8.2)	Duplex	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
		T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
unmodifiziert	S01-S02	$T_m = 44,3^\circ\text{C}$			
p_s	S02-S19	43,0	-1,3	41,9	-2,4
S	S02-S18	43,2	-1,1	39,9	-4,4
B	S02-S03	45,5	+1,2	41,0	-3,3
D	S02-S04	37,8	-6,5	39,8	-4,5
E	S02-S05	37,1	-7,2	39,3	-5,0
F	S02-S06	36,6	-7,7	38,9	-5,4
H	S02-S07	36,2	-8,1	38,9	-5,4
I	S02-S08	46,0	+1,7	40,8	-3,5
J	S02-S09	34,4	-9,9	36,8	-7,5
K	S02-S10	30,0	-14,3	31,7	-12,6
L	S02-S11	36,4	-7,9	34,2	-10,1

Die postulierte π - π -Wechselwirkungen werden durch die T_m -Werte der (naphth-1-yl)methylmodifizierten Duplexe **I** untermauert. Aufgrund des größeren Ringsystems kommt es zu einer Schmelzpunkterhöhung des Duplexes mit der Rp-konfigurierten Modifikation **S02-S08Rp** um 1,7°C im Vergleich zum unmodifizierten und um 0,5°C zum benzylmodifizierten Duplex **S02-S03Rp**. Es kann zudem festgestellt werden, dass bei räumlich anspruchsvolleren Modifikationen die T_m -Wert-Differenz zwischen den Isomeren deutlich zunimmt. Erstaunlicherweise zeigen der Rp- wie auch der Sp-konfigurierte 2-naphtoxymodifizierte Duplex **S02-S11** im Vergleich zu den (naphth-1-yl)methylmodifizierten Duplexen **S02-S08** deutlich geringere T_m -Werte (Tab. 8.1).

Betrachtet man die Schmelzpunkte der 2-phenylethyl- (**D**), 3-phenylpropyl- (**E**), 4-phenylbutyl- (**F**), und 5-phenylpentylmodifizierten (**H**) Hexamer-Duplexe ergeben sich signifikante Unterschiede zum benzylmodifizierten Pendant **B**. In allen Fällen weisen hier die Duplexe mit der Sp-konfigurierten Modifikation deutlich höhere Schmelzpunkte auf als diejenigen mit der Rp-konfigurierten Modifikation (Abb. 8.4). Beide Isomere zeigen jedoch jeweils deutlich niedrigere T_m -Werte als der unmodifizierte Duplex **S01-S02**.

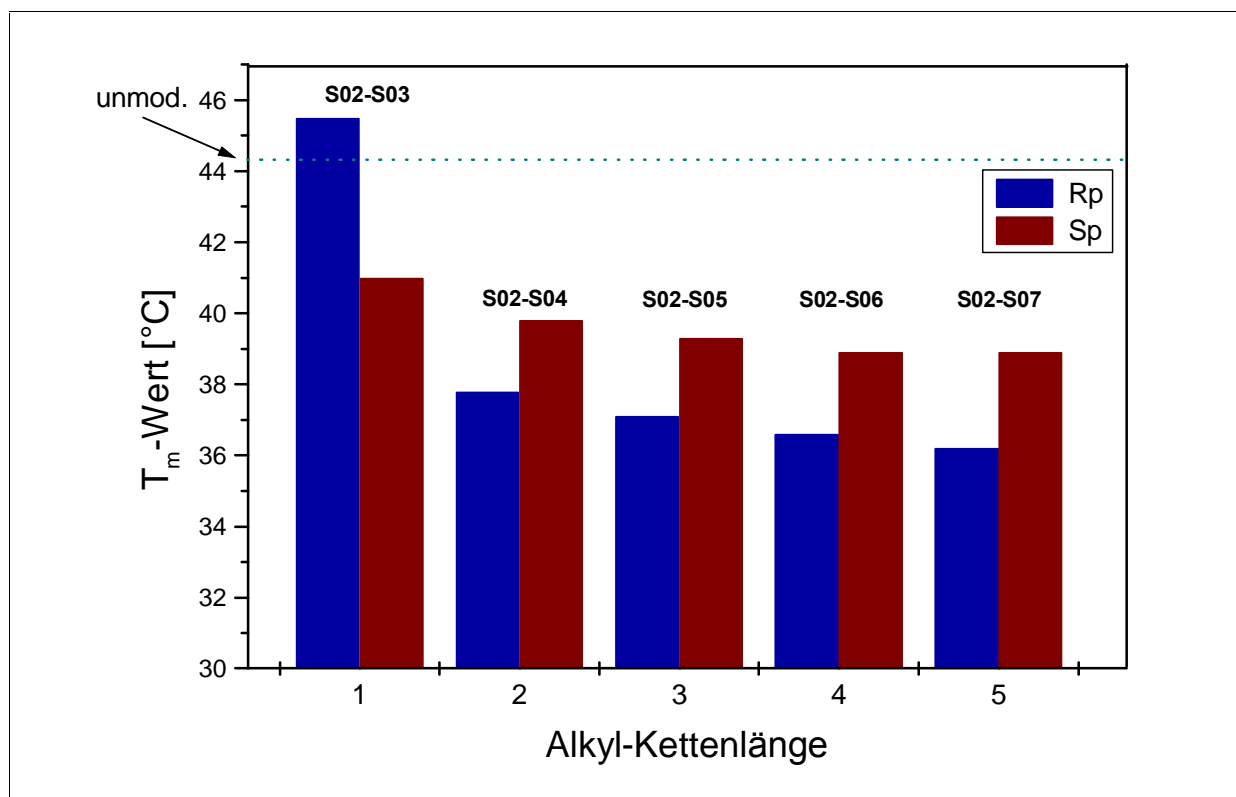


Abb. 8.4 T_m -Werte der phenylalkylmodifizierten Oligonucleotid-Duplexe in Abhängigkeit der Alkylkettenlänge. Der T_m -Wert des unmodifizierten Hexamer-Duplex **S01-S02** beträgt 44,3°C.

Die Umkehrung der Stabilitätsreihenfolge $R_p \leftrightarrow S_p$ ist mit der Verlängerung der Alkylkettenlänge von Benzyl ($n=1$) zu 2-Phenylethyl ($n=2$) verbunden. Vergleicht man die S_p - wie auch die R_p -konfigurierten Duplexe von **S02-S04**, **S02-S05**, **S02-S06**, **S02-S07** untereinander sind die T_m -Wert-Unterschiede nur noch gering. In Abbildung 8.4 ist dies zur Veranschaulichung graphisch dargestellt. Mit der Verlängerung der Alkylkettenlänge ergibt sich für den Phenylring der S_p -konfigurierten Modifikation die Möglichkeit mit dem Oligonucleotid-Rückgrat in Wechselwirkung zu treten, was eine Stabilisierung gegenüber dem R_p -konfigurierten Pendant bewirkt. Dies verdeutlichen auch Raummodelle bei denen ersichtlich wird, dass die längerkettigen, R_p -konfigurierten Modifikationen in die wässrige Lösung hinaus stehen, während die S_p -konfigurierten Modifikationen die Möglichkeit haben mit dem Duplex-Rückgrat in Wechselwirkung zu treten (Lehmann, 2001). Eine Interkalation ist, vermutlich aufgrund der hohen Elektronendichte des aromatischen Ringsystems, nicht möglich. Mit der 3-(Naphth-1-yl)propyl- (**J**) und der 3-(Anthracen-9-yl)propylmodifikation (**K**) sollte der Einfluss der Ringgröße bei längerer Alkylkette auf die Duplex-Stabilität untersucht werden.

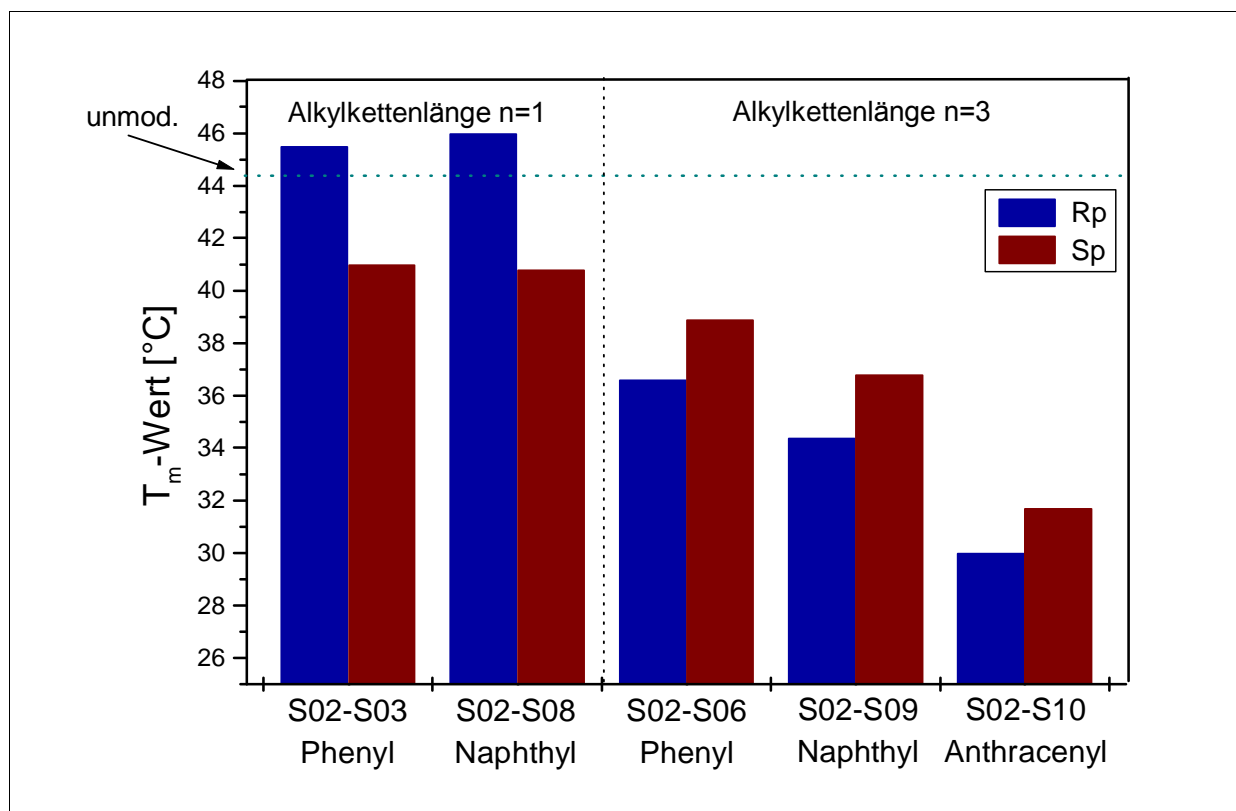


Abb. 8.5 T_m -Werte der modifizierten Oligonucleotid-Duplexe in Abhängigkeit der Ringgröße des aromatischen Systems.

Erstaunlicherweise zeigen die Duplexe eine deutliche T_m -Wert-Erniedrigung. Auch hier ergeben die Sp-konfigurierten Modifikationen höhere Schmelzpunkte als die Rp-konfigurierten, jedoch mit zunehmender Ringgröße von Phenyl über Naphthyl zu Anthracenyl nehmen die Schmelzwerte drastisch ab (Tab. 8.1). Dies steht im Gegensatz zu den Resultaten die mit den benzyl- (**B**) und (naphth-1-yl)methylmodifizierten (**I**) Duplexen **S02-S03**, **S02-S08** erhalten wurden. Für die bessere Veranschaulichung sind diese Ergebnisse in Abbildung 8.5 nochmals graphisch aufgearbeitet.

In Tabelle 8.2 sind die T_m -Werte der ringsubstituierten phenylalkylmodifizierten Oligonucleotid-Duplexe aufgeführt und in Abbildung 8.6 graphisch dargestellt. Wie bei den Benzylphosphonaten (**B**) zeigen auch hier die Rp-konfigurierten Duplexe höhere Schmelzpunkte als die Sp-konfigurierten Isomere. Im Falle der längerkettigen 4-(p-fluorphenyl)butylmodifizierten Duplexe **S02-S17** dreht sich diese Stabilitätsreihenfolge erneut um. Bei der Einführung der p-Methylbenzylmodifikation (**O**) kommt es zu einer signifikanten Erniedrigung des T_m -Wertes beider Isomere im Vergleich zu den Benzylphosphonat-Duplexen **S02-S03** und dem unmodifizierten Mutterstrang **S01-S02**.

Tab. 8.2 T_m -Werte der nicht selbstkomplementären CG-Hexamere. Gemessen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Wellenlänge von 274 nm, Einzelstrangkonzentration: 9,0 μ M, Fehlergrenze: $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

Modifikations- typ (Abb. 8.2)	Duplex	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
		T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]
unmodifiziert	S01-S02	$T_m = 44,3^\circ\text{C}$			
B	S02-S03	45,5	+1,2	41,0	-3,3
O	S02-S14	40,7	-3,6	37,9	-6,4
Q	S02-S16	36,9	-7,4	36,3	-8,0
P	S02-S15	43,2	-1,1	38,2	-6,1
N	S02-S13	43,3	-1,0	38,8	-5,5
F	S02-S06	36,6	-7,7	38,9	-5,4
R	S02-S17	35,1	-9,2	37,4	-6,9
M	S02-S12	46,0	+1,7	41,5	-2,8

Diese T_m -Wert-Erniedrigung ist auf die gestörte Wechselwirkung des aromatischen Systems mit dem Oligonucleotid-Rückgrat zurückzuführen. Die Betrachtung der Schmelzpunkte der p-(t-butyl)benzylmodifizierten Duplexe (**Q**) bestätigt diese Erklärung.

Die sterisch äußerst anspruchsvolle *tert*-Butylgruppe führt dabei zu einer Reduzierung des T_m -Wertes des Rp-konfigurierten p-(*t*-Butyl)benzylphosphonates **S02-S16Rp** um 8,6°C im Vergleich zum Rp-konfigurierten Benzylphosphonat **S02-S03Rp**. Zudem beträgt der T_m -Wert-Unterschied zwischen dem Rp- und Sp-konfiguriertem Isomer **S02-S16** nur noch 0,6°C, während bei den Benzylisomeren **S02-S03Rp** und **S02-S03Sp** eine Differenz von 4,5°C ermittelt wurde. Im Falle der p-Methoxybenzylphosphonate (**P**) fällt die Destabilisierung der entsprechenden Duplexe geringer aus. Vor allem das Rp-konfigurierte Isomer **S02-S15Rp** zeigt lediglich eine T_m -Wert-Erniedrigung von 1,1°C im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S01-S02**. Die signifikanteste T_m -Wert-Steigerung konnte mit dem Rp-konfigurierten 2,4-Difluorbenzylphosphonat **S02-S12Rp** beobachtet werden.

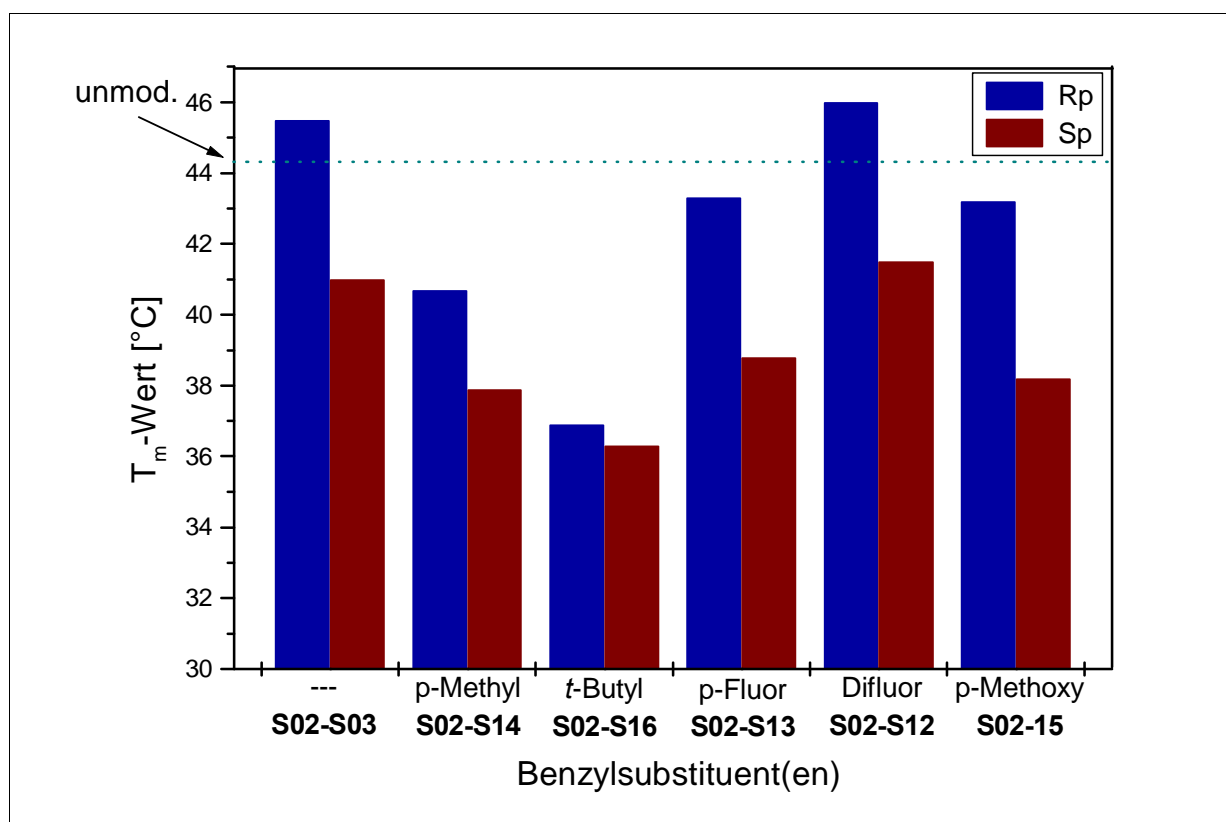


Abb. 8.6 T_m -Werte der unterschiedlich ringsubstituierten benzylmodifizierten Oligonucleotid-Duplexe.

Der Schmelzpunkt dieses Hexamers beträgt 46,0°C, was einer Erhöhung von 1,7°C im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S01-S02** entspricht. Der hohe T_m -Wert ist auf die besonders ausgeprägten π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Ringsystem und dem Oligonucleotid zurückzuführen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten die

von Parsch ermittelt wurden (Parsch, 2000; Parsch, 2002). Dabei zeigte das 2,4-Difluorbenzol als Basen-Analogon hervorragende Stacking-Eigenschaften. Erstaunlicherweise ergab das p-Fluorbenzylphosphonat **S02-S13Rp** keinen stabilisierenden Effekt auf den resultierenden Duplex.

Die Benzyl- (**B**), 2-Phenylethyl- (**D**), 3-Phenylpropyl- (**E**) und 5-Phenylpentylmodifikationen (**H**) wurden zudem in die mittlere Position des selbstkomplementären Hexamers 5'-d(CGC•GCG) eingebaut und die resultierenden T_m -Werte gemessen (Tab. 8.3). Die ermittelten Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit denen für das nicht selbstkomplementäre CG-Hexamer gefundenen Daten. Da die selbstkomplementären Duplexe jeweils zwei Modifikationen tragen, fielen die T_m -Wert-Unterschiede in der Regel deutlich höher aus. Es konnte nahezu ein additiver Effekt der T_m -Wert-Differenzen im Vergleich zu den entsprechenden einfach modifizierten, nicht selbstkomplementären CG-Hexameren ermittelt werden.

Tab. 8.3 T_m -Werte der selbstkomplementären CG-Hexamere. Gemessen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Wellenlänge von 274 nm, Konzentration: 18,0 μ M, Fehlergrenze: $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

Modifikations- typ (Abb. 8.2)	Duplex	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
		T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔT_m [$^\circ\text{C}$]
unmodifiziert	S40	$T_m = 49,1^\circ\text{C}$			
B	S41	49,8	+0,7	47,2	-1,9
D	S42	33,0	-16,1	40,9	-8,2
E	S43	31,6	-17,5	40,5	-8,6
H	S44	32,3	-16,8	40,6	-8,5

Im Falle des Benzylphosphonats **S41Rp** konnte eine Erhöhung des T_m -Wertes im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S40** festgestellt werden, während das Sp-konfigurierte Pendant einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweist. Die Verlängerung der Alkylkettenlänge bei den Modifikationen **B**, **D** und **H** führt wiederum zu einem Wechsel der Stabilitätsreihenfolge $\text{Rp} \leftrightarrow \text{Sp}$. Die Sp-konfigurierten Duplexe **S42Sp**, **S43Sp** und **S44Sp** weisen höhere T_m -Werte auf als die entsprechenden Rp-konfigurierten Duplexe **S42Rp**, **S43Rp** und **S44Rp**. Beide Isomere zeigen dabei jeweils eine signifikante T_m -Wert-Erniedrigung im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S40**.

8.1.2 T_m -Werte modifizierter Dodecamere

Um den Einfluss der Modifikationsstelle im Oligonucleotid auf die Schmelztemperaturen der resultierenden Duplexe zu untersuchen, wurde ein Dodecamer-Modell-Oligonucleotid gewählt und jeweils an drei unterschiedlichen Positionen modifiziert.

Die Modifikationsstellen lagen a) in der mittigen Position 5'-d(CAGGTC•AATCAT), b) an der vorletzten Position des 3'-Endes 5'-d(CAGGTCAATC•AT) und c) am 5'-Ende 5'-d(C•AGGTCAATCAT). Die jeweilige Modifikationsstelle in der Sequenz ist durch einen Punkt gekennzeichnet. Es wurden die Benzylphosphonate (**B**), 2,4-Difluorbenzylphosphonate (**M**), (Naphth-1-yl)methylphosphonate (**I**), 3-Phenylpropylphosphonate (**E**), 3-(Naphth-1-yl)propylphosphonate (**J**) und die 3-(Anthracen-9-yl)propylphosphonate (**K**) synthetisiert und die T_m -Werte der entsprechenden diastereoisomerenreinen Duplexe gemessen (Tab. 8.4).

Die Schmelzpunkte der an der mittleren Position modifizierten Oligonucleotid-Duplexe (a) stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die im Falle der CG-Hexamere (Kap. 8.1.1) ermittelt wurden. Im Falle der Benzylphosphonate (**B**), 2,4-Difluorbenzylphosphonate (**M**) und (Naphth-1-yl)methylphosphonate (**I**) besitzen die Duplexe mit einer Rp-konfigurierten Modifikation die höheren T_m -Werte als diejenigen mit einer Sp-konfigurierten Modifikation. Die T_m -Werte der Rp-konfigurierten Duplexe liegen dabei auch über dem des unmodifizierten Analogons **S20-S21**.

Betrachtet man die Schmelzpunkte der Rp-konfigurierten Oligonucleotid-Duplexe mit den anderen Modifikationsstellen so fällt auf, dass der Schmelzpunkt niedriger ist, je weiter die Modifikation an den Enden der Sequenz platziert ist. Im Gegensatz dazu kommt es im Falle der Sp-konfigurierten Duplexe der Benzylphosphonate (**B**), 2,4-Difluorbenzylphosphonate (**M**) und (Naphth-1-yl)methylphosphonate (**I**) zu einer Erhöhung des T_m -Wertes. Die Angleichung der T_m -Werte von den Rp- und Sp-konfigurierten Isomeren führt zu nahezu identischen Schmelzpunkten bei den am 5'-Ende modifizierten Oligonucleotid-Duplexen **S20-S24**, **S20-S27** und **S20-S33**. In Abbildung 8.7 sind die erhaltenen Schmelzpunkte zur Veranschaulichung graphisch dargestellt.

Tab. 8.4 T_m -Werte der nicht selbstkomplementären Dodecamere. Gemessen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Wellenlänge von 260 nm, a) mittlere Modifikationsstelle 5'-d(CAGGTC•AATCAT), b) Modifikationsstelle an der vorletzten Position des 3'-Endes 5'-d(CAGGTCAATC•AT), c) Modifikation am 5'-Ende 5'-d(C•AGGTCAATCAT), Einzelstrangkonzentration: 4,0 μ M.

Modifikations-		Duplex	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
typ	ort		T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
unmodifiziert		S20-S21	$T_m = 46,4^\circ\text{C}$			
B	a	S20-S22	46,5	+0,1	43,8	-2,6
	b	S20-S23	46,2	-0,2	44,6	-1,8
	c	S20-S24	44,6	-1,8	44,8	-1,6
M	a	S20-S25	47,2	+1,2	44,5	-1,9
	b	S20-S26	46,5	+0,1	44,5	-1,9
	c	S20-S27	44,6	-1,8	44,9	-1,5
I	a	S20-S31	46,9	+0,5	43,7	-2,7
	b	S20-S32	46,5	+0,1	45,7	-0,7
	c	S20-S33	45,7	-0,7	45,8	-0,6
E	a	S20-S28	43,4	-3,0	44,3	-2,1
	b	S20-S29	43,6	-2,8	45,6	-0,8
	c	S20-S30	43,6	-2,8	45,6	-0,8
J	a	S20-S34	39,5	-6,9	41,5	-4,6
	b	S20-S35	41,4	-5,0	43,2	-3,2
	c	S20-S36	45,2	-1,2	47,2	+0,8
K	a	S20-S37	39,5	-6,9	40,6	-5,6
	b	S20-S38	43,4	-3,0	44,1	-2,3
	c	S20-S39	47,3	+0,9	51,2	+4,8

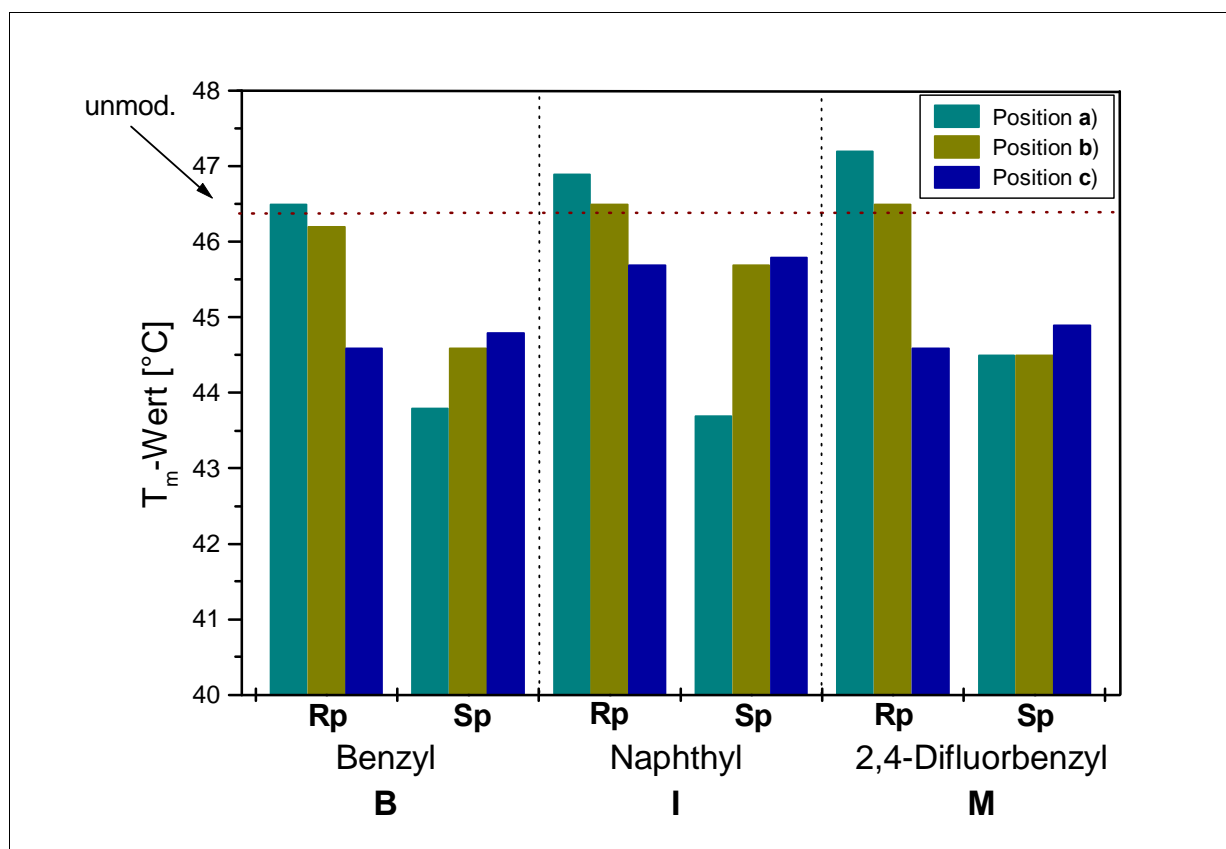


Abb. 8.7 T_m -Werte der modifizierten Dodecamer-Duplexe in Abhängigkeit der Position der Modifikation im Oligonucleotid. Betrachtet werden die Modifikationen mit einer Alkylkettenlänge von $n=1$. Der T_m -Wert des unmodifizierten Dodecamer-Duplex **S20-S21** beträgt $46,4^\circ\text{C}$.

Bei der Betrachtung der Schmelzpunkte der 3-Phenylpropylphosphonate (**E**), 3-(Naphth-1-yl)propylphosphonate (**J**) und 3-(Anthracen-9-yl)propylphosphonate (**K**), die jeweils einen C3-Alkyllinker besitzen, kommt man zu gänzlich anderen Gesetzmäßigkeiten. Zur besseren Veranschaulichung sind auch hier die T_m -Werte in Abbildung 8.8 graphisch dargestellt.

In allen Fällen weisen, unabhängig von der Modifikationsposition, die Duplexe mit den Sp-konfigurierten Modifikationen einen höheren T_m -Wert auf als jene mit dem Rp-konfigurierten Analogon. Jedoch kommt es zu einer Erhöhung des T_m -Wertes je weiter die Modifikation am Ende des Duplexes platziert ist. Der Schmelzpunktanstieg ist bei den Sp-konfigurierten Duplexen signifikant höher als bei den Rp-konfigurierten Doppelsträngen. Im Falle des Sp-konfigurierten 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplex **S20-S39Sp** wurde ein um $4,8^\circ\text{C}$ höherer T_m -Wert als bei dem unmodifizierten Mutterstrang **S20-S21** ermittelt. Diese deutliche Schmelzpunkterhöhung ist auf einen „Dangling-End-Effekt“ zurückzuführen. Dabei kommt es zu einer ausgeprägten π - π -

Wechselwirkung zwischen dem Anthracenring und der letzten Nucleobase des Oligonucleotides (vgl. Kap. 3.4). Dies wird ebenfalls durch die Messungen von Kool bestätigt. Er verwendete u.a. Anthracen-Nucleobasen-Nucleosid-Analoga als Überhänge in Oligonucleotid-Duplexen um den „Dangling-End-Effekt“ zu untersuchen (Kool, 1997; Guckian, 1996). Dabei erhielt er eine T_m -Wert-Erhöhung von 8°C für den anthracen-modifizierten Duplex.

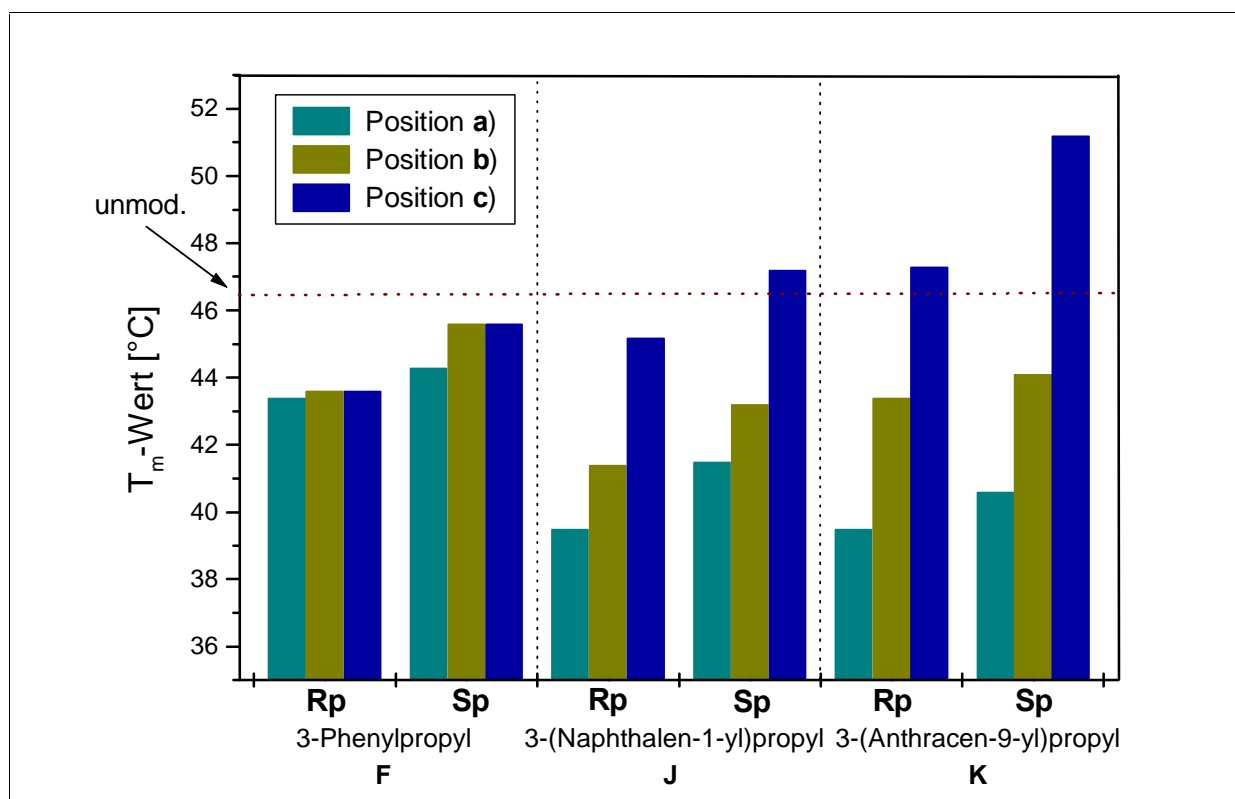


Abb. 8.8 T_m -Werte der modifizierten Dodecamer-Duplexe in Abhängigkeit der Position der Modifikation im Oligonucleotid. Betrachtet werden die Modifikationen mit einer Alkylkettenlänge von $n=3$. Der T_m -Wert des unmodifizierten Dodecamer-Duplex **S20-S21** beträgt 46,4°C.

8.1.3 Stabilisierung von DNA-Ausbuchtungen?

Die Untersuchungen an der ausgewählten DNA mit einer Ausbuchtung sollen eine Anwendungsmöglichkeit der Arylalkyl-Rückgratmodifikationen aufzeigen. Die Ergebnisse sollen dabei nur als Grundlage für folgende Forschungsarbeiten dienen.

Die Messungen wurden an dem Modell-Duplex **S45-S46** durchgeführt, welcher nur eine einzelne Ausbuchtung aufweist. Der ermittelte Schmelzpunkt von 33,6°C liegt in einem Temperaturbereich, in dem T_m -Wert-Veränderungen sehr gut mittels der UV-Spektroskopie verfolgt werden können. Zum besseren Vergleich der erhaltenen Werte wurde auch der Modell-Duplex ohne Ausbuchtung **S46-S48** synthetisiert. Dieser weist einen Schmelzpunkt von 52,3°C auf. Erste Modelling-Experimente zeigten, dass Rückgratmodifikationen mit einer Linkerlänge von fünf bzw. sechs (CH₂)-Gruppen die maximale Überlappung zwischen dem aromatischem System und der Nucleobase der Ausbuchtung gewährleisten. Durch die daraus resultierenden π - π -Wechselwirkungen sollte der Duplex stabilisiert werden. Aufgrund dessen wurde die erste Phosphatgruppe nach der Ausbuchtung mit der 5-Phenylpentylmodifikation (**H**) versehen.

Tab. 8.5 Schmelzpunkte zur Bestimmung der Stabilisierung von DNA-Ausbuchtungen durch die 5-Phenylpentyl-Rückgratmodifikation. Gemessen in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) bei einer Wellenlänge von 260 nm, Einzelstrangkonzentration 5,0 μ M, Fehlergrenze: $\pm 0,4^\circ\text{C}$.

Oligonucleotid-Duplexe	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
5'-d(CGTC ^A CGACAT) S45 3'-d(GCAG GCTGTA) S46	$T_m = 33,6^\circ\text{C}$			
5'-d(CGTC ^A H•GACAT) S45 3'-d(GCAG G CTGTA) S47	32,7	-0,9	33,4	-0,2
5'-d(CGTCCGACAT) S48 3'-d(GCAGGCTGTA) S46	$T_m = 52,3^\circ\text{C}$			
5'-d(CGTCH•GACAT) S49 3'-d(GCAGGCTGTA) S46	46,1	-6,2	47,4	-4,9

Die daraus resultierenden T_m -Werte sind, unabhängig von der absoluten Konfiguration der Modifikation, nur unwesentlich geringer als die des unmodifizierten Duplex **S45-S46**. Führt man hingegen die 5-Phenylpentylmodifikation in den Duplex ohne Ausbuchtung ein, so kommt es zu einer deutlichen T_m -Wert-Erniedrigung der erhaltenen Duplexe **S46-S49Rp** und **S46-S49Sp**.

Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, DNA-Ausbuchtungen in Zukunft mittels Arylalkylmodifikationen zu stabilisieren. Für folgende Arbeiten sollten mittels Modelling-Experimenten die ideale Linkerlänge wie auch die geeignete Ringgröße des aromatischen Systems ermittelt werden.

8.2 Fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen

Die Messungen wurden mit den 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Oligonucleotiden **S37Rp**, **S38Rp**, **S39Rp**, **S37Sp**, **S38Sp** und **S39Sp** durchgeführt. Von den synthetisierten Rückgratmodifikationen zeigt lediglich das Anthracenringsystem die benötigte Eigenfluoreszenz. Es wurde jeweils das Fluoreszenzspektrum des modifizierten Einzelstranges und des entsprechenden Duplexes nach Hybridisierung mit dem Gegenstrang **S20** aufgenommen. Durch den Vergleich der Spektren vor und nach der Hybridisierung lassen sich Rückschlüsse über die Wechselwirkung zwischen dem Fluorophor und dem Oligonucleotid-Duplex ziehen (Clegg, 1992). Über die Zu beziehungsweise Abnahme der Fluoreszenz-Intensität lässt sich feststellen, ob eine Interkalation, „Groove-Bindung“ oder eine „Dangling-End-Wechselwirkung“ vorliegt (Puri, 1997; Asseline, 1997). Im Falle des Anthracenringsystems wurden diesbezüglich bereits einige Untersuchungen durchgeführt. Bei der Einführung der (Anthracen-2-yl)methylgruppe über die 2'-Hydroxyfunktion von Uridin in Oligonucleotide wurde nach der Duplexbildung ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz-Intensität beobachtet (Yamana, 1995). Wird hingegen die (Anthracen-9-yl)methylgruppe über die exocyclische Aminofunktion des 2'-Desoxyguanosins in Oligonucleotide eingeführt kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenz-Intensität nach der Duplexbildung (Casale, 1990). Die Messungen wurden bei 20°C in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), der 140 mM NaCl enthielt, durchgeführt. Die Einzelstrangkonzentration betrug jeweils 0,2 μ M. Für die Messung der Fluoreszenzspektren wurde mit einer Einstrahlwellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}}=255$ nm gearbeitet. Die erhaltenen Spektren sind in den Abbildungen 8.9 a-f wiedergegeben. Die Spektren der modifizierten, einzelsträngigen Oligonucleotide sind in schwarz, die der entsprechenden Duplexe in rot abgebildet. Die einzelsträngigen Oligonucleotide zeigen jeweils ein ausgeprägtes Maximum bei 424 nm und 402 nm. Nach der Duplexbildung ist bei den Doppelsträngen **S20-S37Sp** und **S20-S39Sp** eine hypsochrome Verschiebung der Maxima von circa 3 nm zu beobachten. Im Falle der an der mittleren Position modifizierten Oligonucleotide **S37Rp** und **S37Sp** kommt es nach der Hybridisierung zu einem geringfügigen Anstieg der Fluoreszenz-Emission (Abb. 8.9 a und b), während bei den Duplexen mit der Modifikation an der vorletzten Position des 3'-Endes (Abbildung 8.9 c und d) und am 5'-Ende (Abbildung 8.9 e und f) eine deutliche Abnahme der

Fluoreszenz-Intensität zu beobachten ist. Die Löschung der Fluoreszenz steht dabei in Korrelation zu den ermittelten Schmelzpunkten der Duplexe (Kap. 8.1.2; Tab. 8.4).

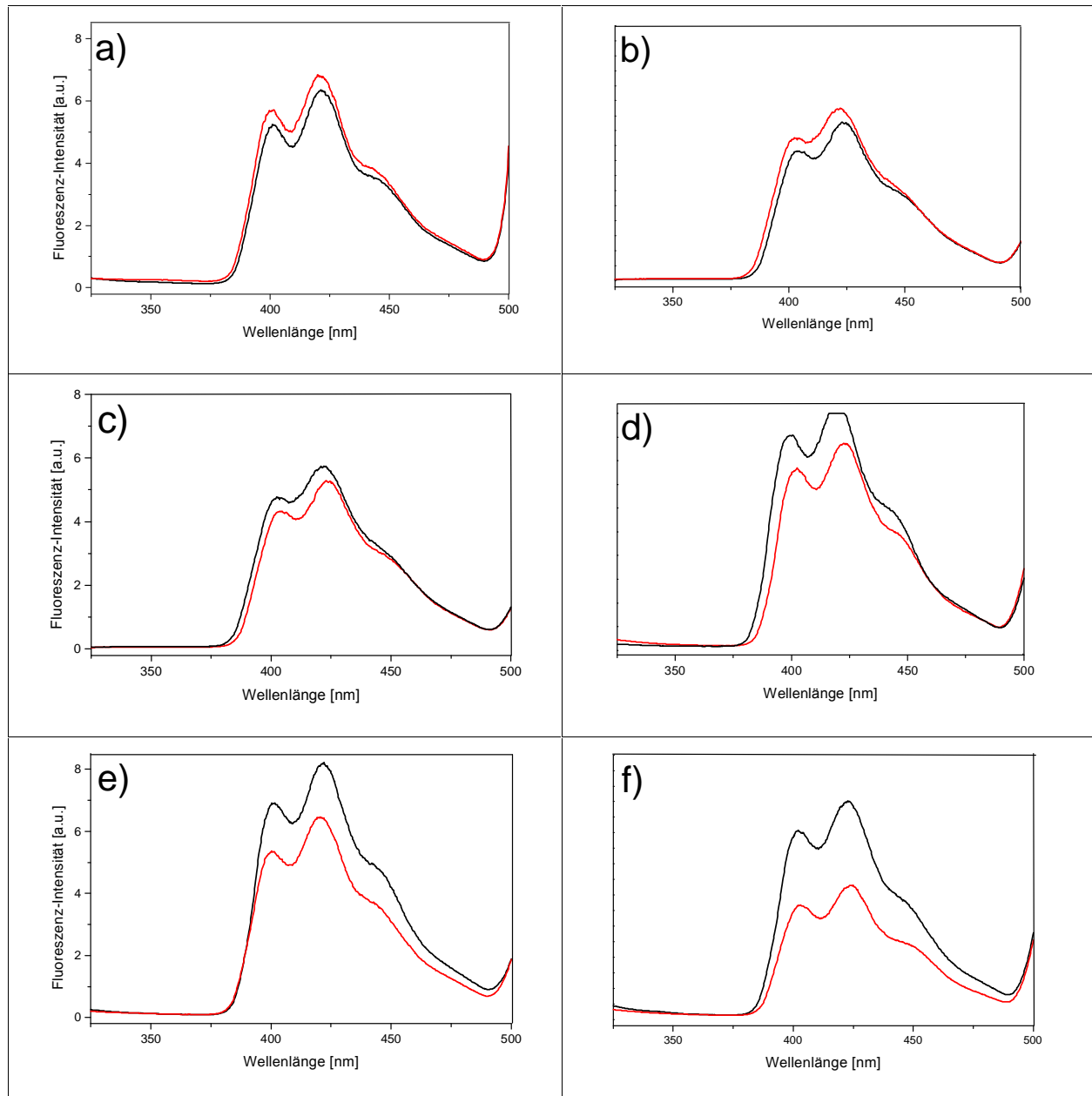


Abb. 8.9 Fluoreszenzspektren der 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Oligonucleotide (**K**). In **schwarz** die Spektren der einzelsträngigen Oligonucleotide, in **rot** die erhaltenen Spektren nach der Hybridisierung mit dem Gegenstrang **S20**. a) **S37Rp** und **S20-S37Rp**, b) **S37Sp** und **S20-S37Sp**, c) **S38Rp** und **S20-S38Rp**, d) **S38Sp** und **S20-S38Sp**, e) **S39Rp** und **S20-S39Rp**, f) **S39Sp** und **S20-S39Sp**; Einstrahlwellenlänge $\lambda_{Ex}=255$ nm

In Tabelle 8.6 sind die Differenzen der Fluoreszenz-Intensitäten im Emissionsmaximum von den einzelsträngigen Oligonucleotiden zu den Duplexen aufgeführt. Zudem sind die ermittelten T_m -Werte der Duplexe wiedergegeben. Bei den an der mittleren Position modifizierten Oligonucleotid-Duplexen **S20-S37Rp** und **S20-S37Sp** kommt es zu keiner Wechselwirkung des Fluorophors mit dem Oligonucleotid, was sich in einer geringen Zunahme der Fluoreszenz-Intensität und in einer signifikanten Abnahme des T_m -Wertes widerspiegelt. Im Falle der am 5'-Ende modifizierten Duplexe **S20-S39Rp** und **S20-S39Sp** ist eine signifikante Reduktion der Fluoreszenz-Intensität von 21% bzw. 37% zu beobachten. Dies deutet auf eine starke π - π -Wechselwirkung zwischen dem Anthracen-Ringsystem und dem Oligonucleotid hin. Bestätigt wird dies durch die deutliche Erhöhung des T_m -Wertes vor allem bei dem Sp-konfigurierten Duplex **S20-S39Sp** von 10,6°C im Vergleich zum mittig modifizierten Pendant **S20-S37Sp**. Die erhaltenen Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen sind eine Bestätigung des postulierten „Dangling-End-Effektes“ im Falle der am 5'-Ende Rückgrat modifizierten Oligonucleotid-Duplexe.

Tab. 8.6 Vergleich der Fluoreszenz-Intensität-Differenz von Einzelstrang zu Doppelstrang am Emissionsmaximum mit den ermittelten T_m -Werten der entsprechenden Duplexe. Untersucht wurden die an unterschiedlichen Positionen 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Oligonucleotide (**K**).

Duplex	Rp-konfiguriertes Isomer		Sp-konfiguriertes Isomer	
	T_m [°C]	ΔE_{\max} [%]	T_m [°C]	ΔE_{\max} [%]
S20-S21	46,4	---	46,4	---
S20-S37	39,5	+10	40,6	+8
S20-S38	43,4	-11	44,1	-18
S20-S39	47,3	-21	51,2	-37

8.3 CD-spektroskopische Untersuchungen

Die Methode der Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung von rechts- und links-circular polarisiertem Licht mit den gelösten optisch aktiven Substanzen (Snatzke, 1981, Snatzke 1982). Da Nucleinsäuren aufgrund der Chiralität der 2'-Desoxyribose bzw. Ribose und der chromophoren Systeme der Nucleobasen CD-Signale zeigen, werden sie seit mehreren Jahrzehnten mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht. Ein CD-Spektrum liefert allerdings keine genaue Strukturinformation, sondern nur ein strukturabhängiges Gesamtbild. Die Intensität und die Lage einzelner Banden kann nur im Vergleich mit Spektren bekannter Strukturen interpretiert werden. Es können jedoch zuverlässige Aussagen über die Sekundär- und Tertiärstruktur gemacht werden, da die entsprechende A-, B- und Z-Form der Helices charakteristische Spektren aufweisen (Gray, 1995; Woody, 1995). Durch Modifikationen hervorgerufene Veränderungen können dadurch sehr genau verfolgt werden. Ferner können, aufgrund der direkten Abhängigkeit der Intensität der Signale von der räumlichen Anordnung der Chromophore, besonders gut Erkenntnisse über Basenstapelungswechselwirkungen (engl.: *base stacking*) gezogen werden. Auch lassen sich Aussagen über Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Nucleinsäuren sowie über die Wechselwirkungen mit Interkalatoren treffen (Berova, 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CD-Untersuchungen wurden an einem JASCO J-710 Spektrometer mit einem thermostatisierten Küvettenhalter gemessen. Für die Aufnahme der Spektren wurden dieselben Probenlösungen wie für die Schmelzpunktmessungen verwendet (Kap. 8.1). Die Duplexe wurden im Wellenlängenbereich von 350-210 nm untersucht. Alle vergleichenden Messungen erfolgten bei 10°C, um zu gewährleisten, dass die beiden Oligonucleotid-Stränge vollständig als Duplex vorliegen. In Abbildung 8.10 sind die CD-Spektren des Rp-konfigurierten 3-(naphth-1-yl)propylmodifizierten Dodecamer-Duplexes **S20-S34Rp** gezeigt. Die Spektren wurden von 5°C bis 70°C - in Schritten von 5°C - aufgenommen. Bei niedrigen Temperaturen zeigen die Spektren die typischen Maxima und Minima einer B-Helix. Es ist sehr gut zu erkennen, wie die Elliptizität des Maximums und des Minimums bei Temperaturerhöhung abnimmt. Diese Abnahme ist mit dem Aufschmelzen der Duplexe verbunden. Mittels der temperaturabhängigen Messung der Veränderung

des positiven bzw. negativen Cotton-Effektes lässt sich ebenfalls der T_m -Wert eines Oligonucleotid-Duplexes bestimmen.

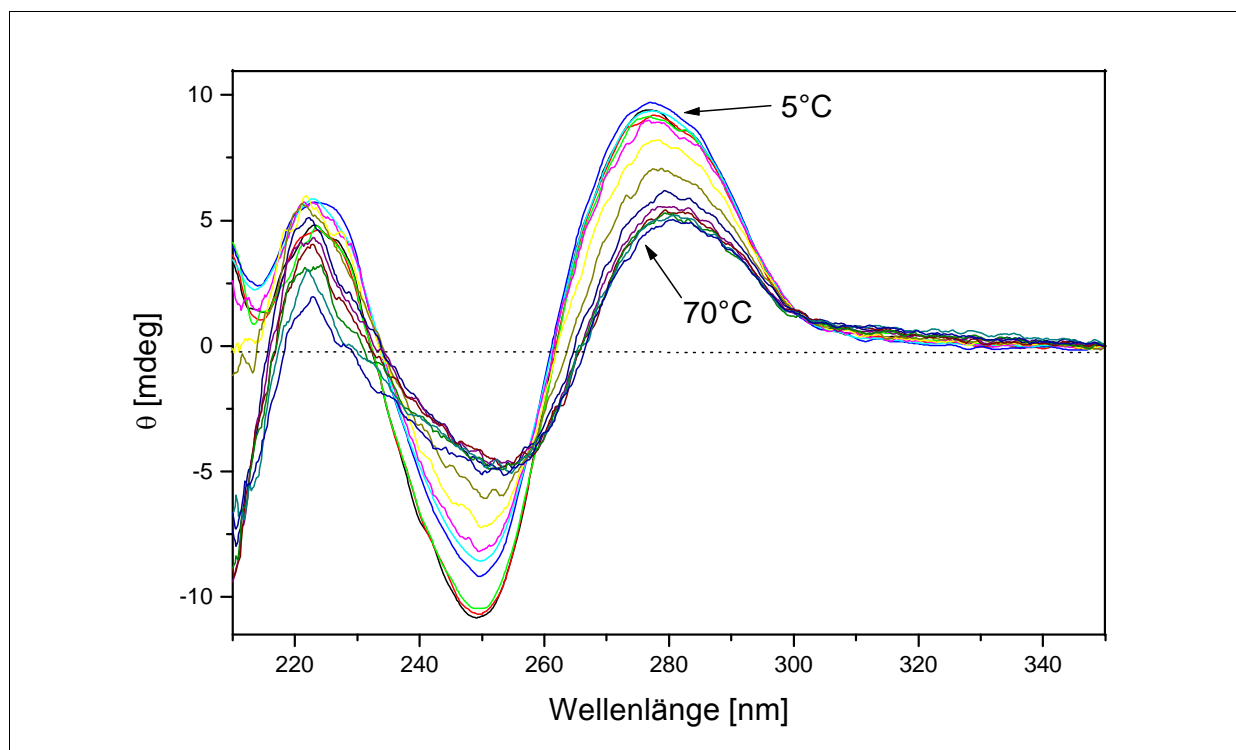


Abb. 8.10 CD-Spektren des 3-(naphth-1-yl)propylmodifizierten Duplex **S20-S34Rp** bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Spektren wurden aufgenommen von 5°C bis 70°C in Schritten von 5°C.

In Abbildung 8.11 sind die Spektren des unmodifizierten Duplex **S01-S02** und der Rp- sowie Sp-konfigurierten benzyl-, 3-phenylpropyl- und 5-phenylpentylmodifizierten Duplexe **S02-S03**, **S02-S05** und **S02-S07** gezeigt. Alle Kurven weisen die typische Form einer B-Helix, mit einem ausgeprägten Minimum bei ca. 250 nm und einem Maximum bei 285 nm auf. Aufgrund des relativ unveränderten Kurvenverlaufs lässt sich der Rückschluss ziehen, dass die ermittelten signifikanten T_m -Wert-Unterschiede der unterschiedlich modifizierten Duplexe nicht auf drastische strukturelle Veränderungen zurückzuführen sind. Wie bereits in Kapitel 8.1.1 postuliert liegt die Ursache für die unterschiedlichen Schmelzpunkte in der Wechselwirkung des Phenylrings mit dem Oligonucleotid. Betrachtet man jeweils das Maximum bei circa 285 nm, so wird ersichtlich, dass der Rp-konfigurierte benzylmodifizierte Duplex **S02-S03Rp** – welcher den höchsten T_m -Wert aufweist - eine deutlich höhere Elliptizität zeigt als sein Sp-konfiguriertes Pendant **S02-S03Sp** und der unmodifizierte Mutterstrang **S01-S02**.

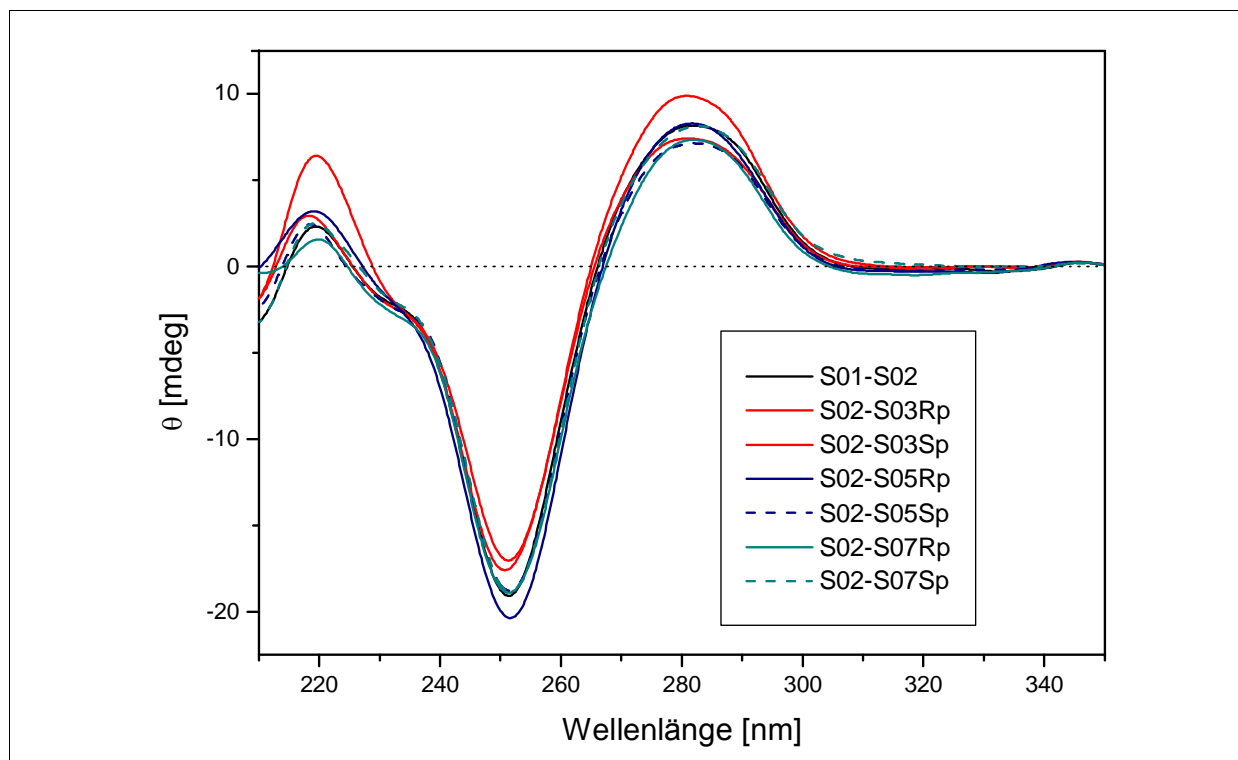


Abb. 8.11 Vergleich der CD-Spektren der phenylalkylmodifizierten Duplexe mit einer Alkylkettenlänge von einer, drei und fünf (CH_2)-Gruppen.

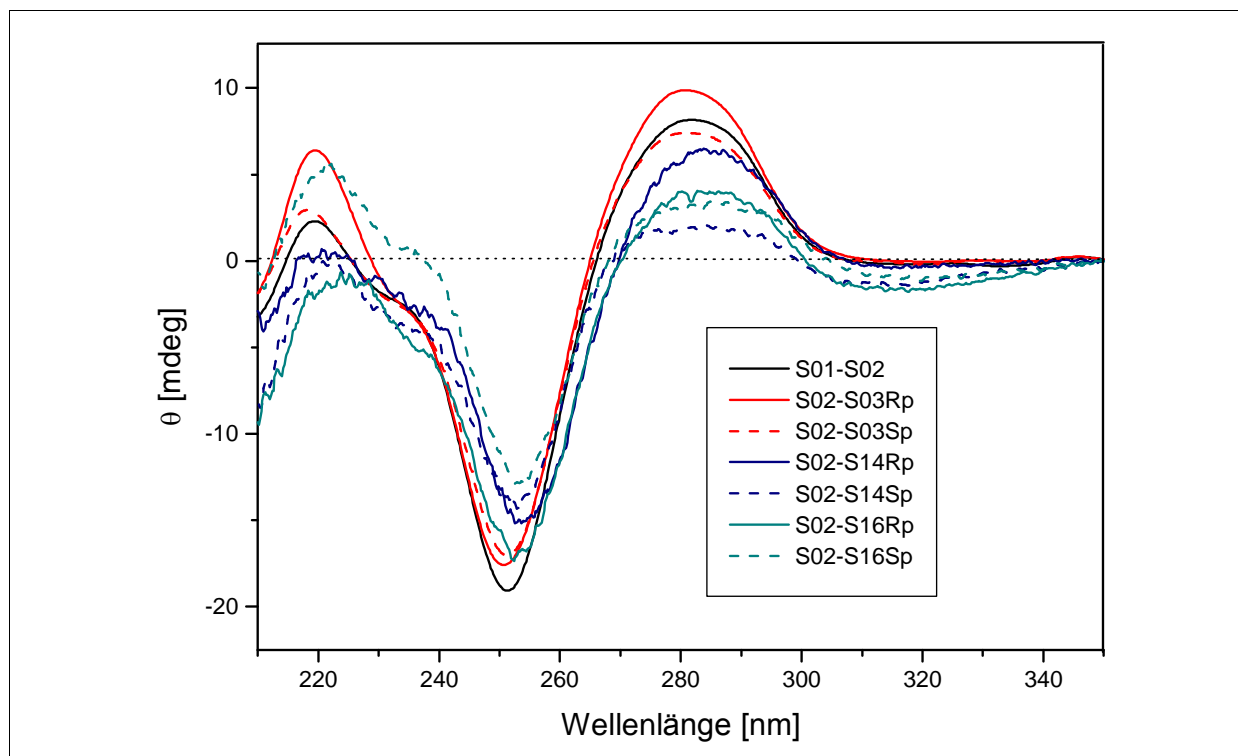


Abb. 8.12 Vergleich der CD-Spektren der benzyl-, p-methylbenzyl- und p-(*t*-butyl)benzyl modifizierten Duplexe **S02-S03**, **S02-S14** und **S02-S16**.

Alle anderen Duplexe – welche niedrigere T_m -Werte aufweisen – zeigen eine geringere Elliptizität als der unmodifizierte Doppelstrang **S01-S02**.

Die Korrelation zwischen den ermittelten T_m -Werten und der Stärke der Elliptizität beim positiven Cotton-Effekt lässt sich ferner durch einen Vergleich der benzyl-, p-methylbenzyl- und p-(*t*-butyl)benzylmodifizierten Duplexe **S02-S03**, **S02-S14** und **S02-S16** zeigen (Abb. 8.12). Aufgrund der Störung der π - π -Wechselwirkung zwischen dem Phenylring und dem Oligonucleotid durch die Substituenten in p-Stellung kommt es zu einer deutlichen Reduktion des T_m -Wertes (siehe Kap. 8.1.1) und zugleich zu einer signifikanten Verringerung der Intensität der positiven Elliptizität. Dieser Effekt ist umso ausgeprägter je sterisch anspruchsvoller der Substituent ist. So zeigten die p-(*t*-butyl)benzylmodifizierten Duplexe **S02-S16Rp** und **S02-S16Sp** eine deutlich geringere Intensität als die p-methylbenzylmodifizierten Duplexe **S02-S14Rp** und **S02-S14Sp**.

Betrachtet man die CD-Spektren der an verschiedenen Positionen (naphth-1-yl)methylmodifizierten Duplexe (**I**), so erkennt man ebenfalls die Korrelation zwischen der Intensität der positiven Elliptizität und des ermittelten T_m -Wertes (Abb. 8.13). Dabei zeigen die Rp- und Sp-konfigurierten, am 5'-Ende modifizierten Duplexe **S20-S33Rp** und **S20-S33Sp** nahezu identische CD-Spektren, während die an mittlerer Position modifizierten Duplexe **S20-S31Rp** und **S20-S31Sp** einen signifikanten Unterschied aufweisen. Zudem kann im Falle der modifizierten Duplexe eine bathochrome Verschiebung des positiven Maximums von circa 8 nm im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S20-S21** ($\lambda_{\max}=281$ nm) beobachtet werden.

In Abbildung 8.14 sind die CD-Spektren der am 5'-Ende 3-phenylpropyl-, 3-(naphth-1-yl)propyl- und 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplexe **S20-S30**, **S20-S36**, **S20-S39** aufgeführt. Zum besseren Vergleich ist auch hier das Spektrum des unmodifizierten Duplexes **S20-S21** gezeigt. Alle Kurven weisen die Form einer B-DNA-Helix auf. Mit Ausnahme des Sp-konfigurierten 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplex **S20-S39Sp** zeigen alle anderen Kurven im Bereich des positiven Maximums eine bathochrome Wellenlängenverschiebung von circa 6 nm im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **S20-S21**. Bei dem 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplex **S20-S39Sp** ist ferner eine stärkere Elliptizität im positiven Maximum zu erkennen, welche durch eine verstärkte Stacking-Wechselwirkung hervorgerufen wird. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit dem postulierten „Dangling-End-Effekt“, der für den erhöhten T_m -Wert dieses Duplexes im Vergleich zum unmodifizierten Pendant **S20-S21** verantwortlich ist.

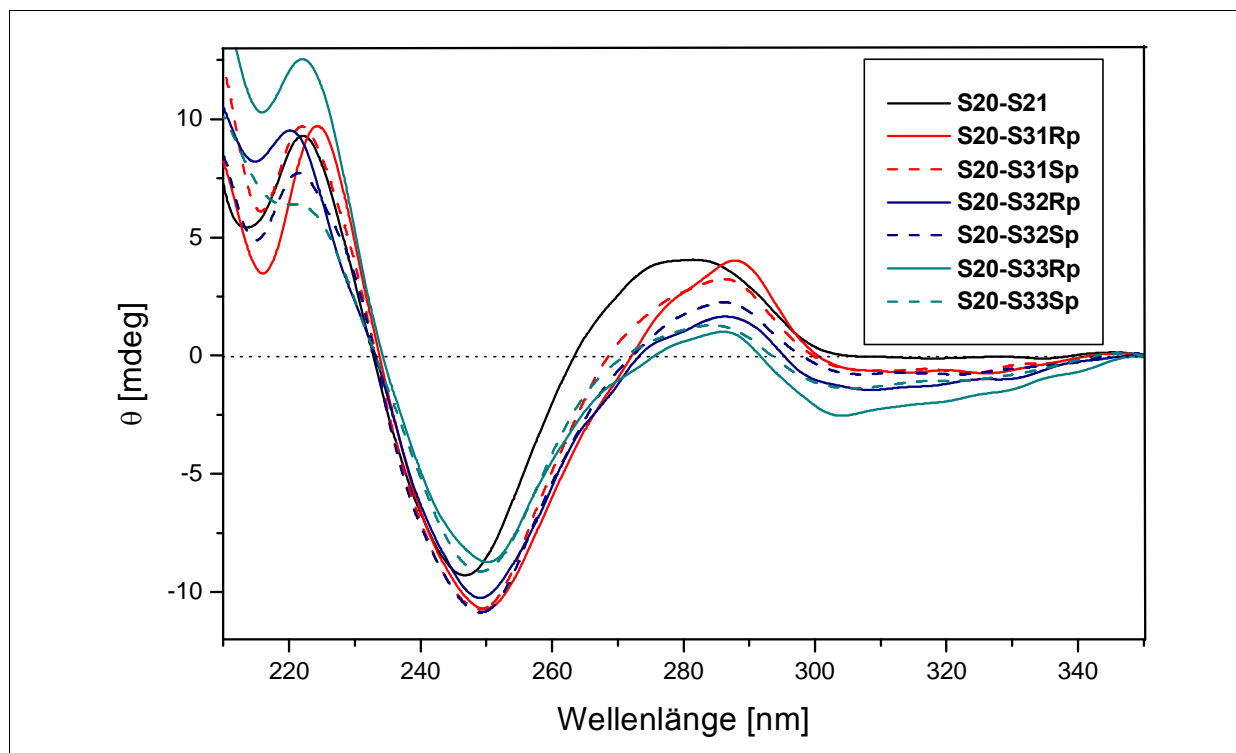


Abb. 8.13 Vergleich der CD-Spektren der an unterschiedlichen Positionen (naphth-1-yl)methylmodifizierten Oligonucleotid-Duplexe (I).

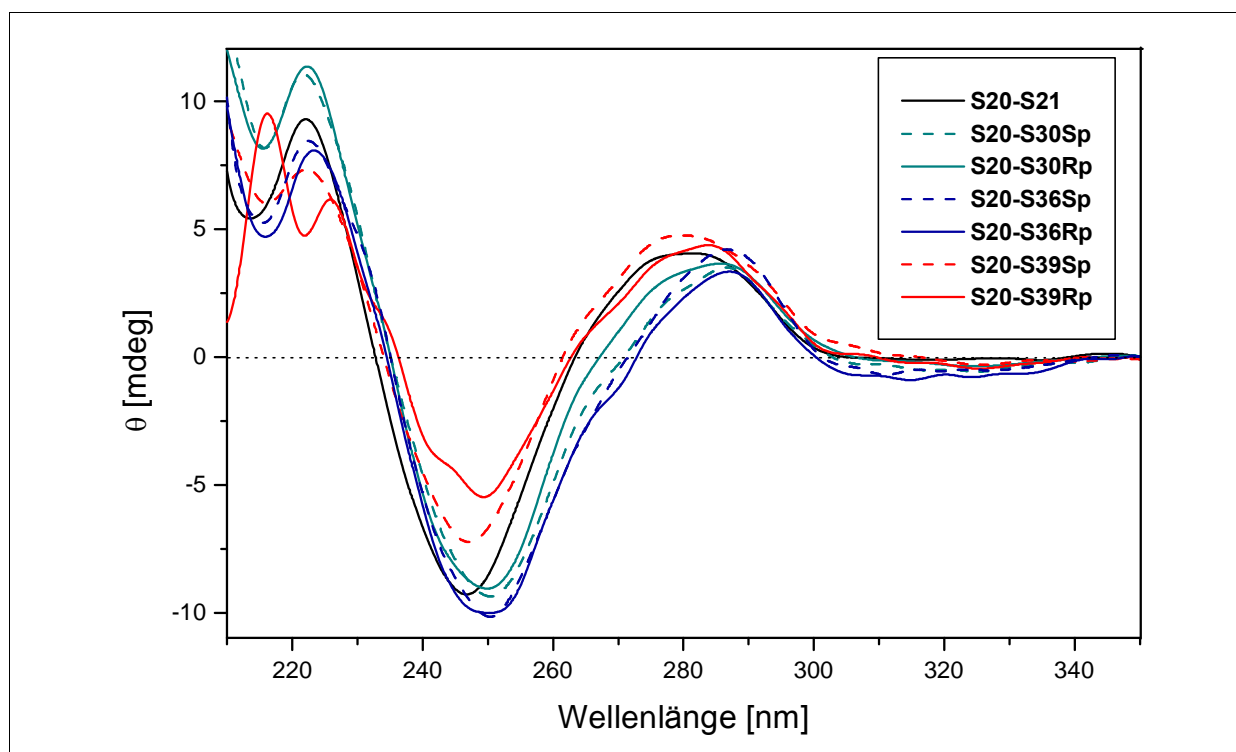


Abb. 8.14. Vergleich der CD-Spektren der am 5'-Ende 3-phenylpropyl-, 3-(naphth-1-yl)propyl- und 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplexe.

Abschließend wurden die Oligonucleotide, die eine Ausbuchtung aufweisen, CD-spektroskopisch untersucht. Hier lässt sich die erhöhte Stacking-Wechselwirkung zwischen der Nucleobase des Nucleosids der Ausbuchtung und des Phenylrings anhand der CD-Spektren erkennen (Abb. 8.15). Die Duplexe **S45-S47Rp** und **S45-S47Sp** zeigen beide im Bereich des positiven Cotton-Effektes von 270-300 nm eine stärkere Elliptizität gegenüber dem unmodifizierten Duplex **S45-S46**, das wie bereits erläutert, auf die Erhöhung der Basenstapelungswechselwirkungen zurückzuführen ist.

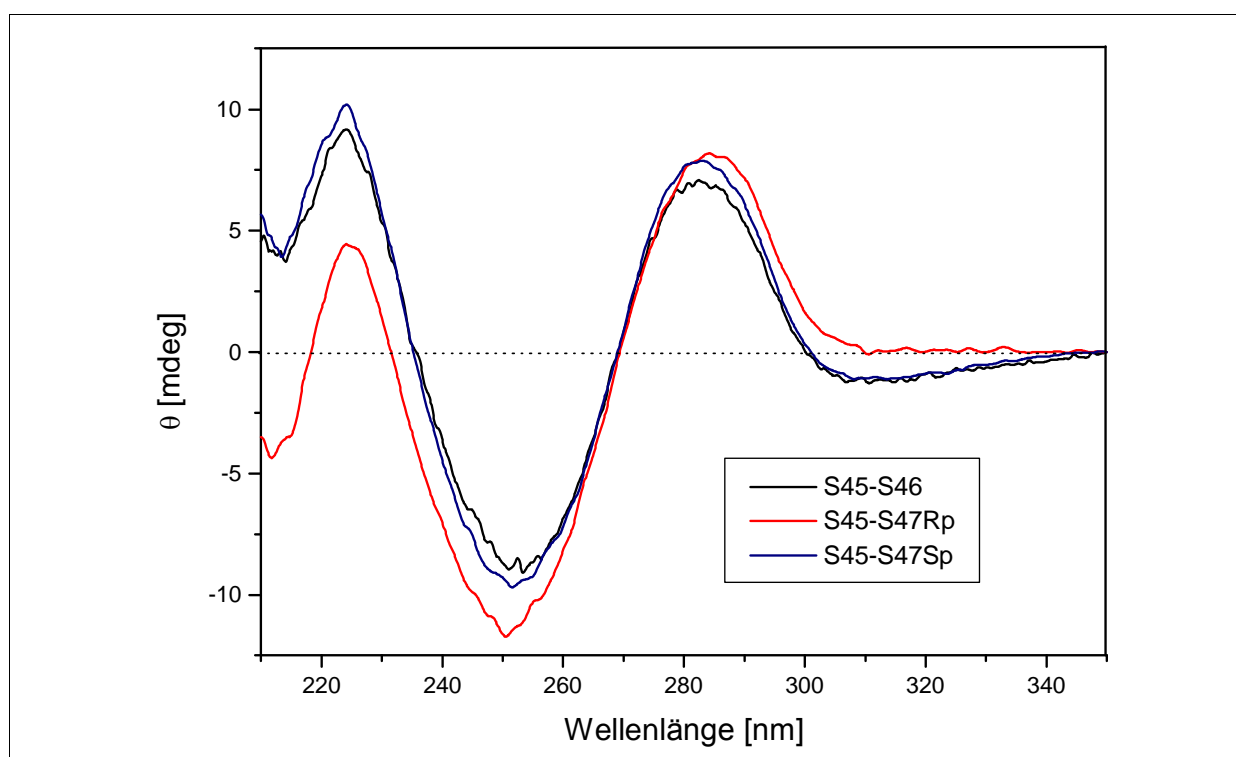


Abb. 8.15 CD-Spektren der Oligonucleotid-Duplexe mit einer Ausbuchtung.

8.4 Lipophilie der Oligonucleotide

Um Aussagen über die Lipophilie von organischen Substanzen treffen zu können, werden entweder deren Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten $\log P$ (Gombar, 1996) oder deren HPLC-Retentionszeiten bestimmt. Mittels dieser Werte lassen sich Aussagen über die Membrangängigkeit der untersuchten Substanzen in biologischen Systemen treffen. Für Nucleinsäuren hat sich die Bestimmung der Lipophilie mittels der HPLC-Retentionszeiten bewährt (Balzarini, 1989). Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass eine Substanz auf einer Umkehrphasen (RP) HPLC-Säule umso längere Retentionszeiten aufweist, je lipophiler sie ist (Lien, 1991).

Der Einfluss der eingeführten Modifikationen auf die Lipophilie der Oligonucleotide wurde anhand der modifizierten, Sp-konfigurierten Hexamere **S01-S19Sp** untersucht. Aufgrund der geringen Länge der Oligonucleotide lassen sich durch Modifikationen hervorgerufene Veränderungen in der Retentionszeit sehr gut verfolgen. Es wurden 0,2 bis 0,3 OD des jeweiligen Oligonucleotids auf eine analytische Säule der Firma Merck (Purospher® STAR RP-18e Material („endcapped“), 5µm) injiziert. Die Chromatographie erfolgte mittels eines Gradienten von 0% bis 30% Acetonitril in 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) innerhalb von 40 Minuten. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min und die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die ermittelten Retentionszeiten sind in Tabelle 8.7 wiedergegeben. Für die bessere Veranschaulichung der Resultate sind die RP-HPLC-Diagramme in den Abbildungen 8.16 und 8.17 dargestellt.

Betrachtet man die unsubstituierten arylalkylmodifizierten Oligonucleotide, so erkennt man, dass die Retentionszeit signifikant von 19,92 Minuten für das benzylmodifizierte Oligonucleotid **S03** zu 28,61 Minuten für das 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierte Hexamer **S10** ansteigt. Die Retentionszeiten der arylalkylmodifizierten Oligonucleotide liegen alle signifikant über denen des unmodifizierten Mutterstranges **S01** mit 15,57 Minuten, des Phosphorthioats **S19** mit 17,37 Minuten und des Methylphosphonates **S18** mit 18,72 Minuten. Die Lipophilie steigt ebenfalls mit der Verlängerung der Alkylkettenlänge. Dies erfolgt in konstanten Zeitschritten von $1,86 \pm 0,1$ Minuten pro Methylengruppe vom benzylmodifizierten Oligonucleotid **S03** mit 19,92 min bis hin zum 5-phenylpentylmodifizierten Hexamer **S07** mit 27,71 min (Abb. 8.16).

Tab. 8.7 RP-HPLC-Retentionszeiten der diastereoisomerenreinen, Sp-konfigurierten Hexamer-Oligonucleotide. Gradient: 0-30% Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) innerhalb von 40 Minuten. Flussrate: 1,0 ml/min.

Nr.	Modifikation	Zeit [min]	Nr.	Modifikation	Zeit [min]
S01	unmodifiziert	15,57	S11	2-naphtoxy L	20,17
S03	benzyl B	19,92	S12	2,4-difluorbenzyl M	21,13
S04	2-phenylethyl D	21,84	S13	4-fluorbenzyl N	20,13
S05	3-phenylpropyl E	23,60	S14	p-methylbenzyl O	21,42
S06	4-phenylbutyl F	25,48	S15	p-methoxybenzyl P	20,42
S07	5-phenylpentyl H	27,71	S16	p-(<i>t</i> -butyl)benzyl Q	24,94
S08	(naphth-1-yl)methyl I	23,03	S17	4-(p-fluor)phenylbutyl R	26,28
S09	(naphth-1-yl)propyl J	26,91	S18	methyl S	18,72
S10	3-(anthracen-9-yl)propyl K	28,61	S19	thioat p_s	17,37

Interessanterweise ist bei der Vergrößerung des Ringsystems von der 3-Phenylpropyl- zur (Naphth-1-yl)propylmodifikation (Stränge **S05** und **S09**) eine Differenz der Retentionszeit von 3,31 min festzustellen, während bei dem Übergang von der (Naphth-1-yl)propyl- zur 3-(Anthracen-9-yl)propylmodifikation (Oligonucleotide **S09** und **S10**) nur ein Anstieg von 1,70 min beobachtet werden kann. Andererseits ist der Retentionszeit-Unterschied zwischen dem benzylmodifizierten Oligonucleotid **S03** und dem 3-phenylpropylmodifizierten Oligomer **S05** (3,68 Minuten) nahezu identisch mit der Differenz zwischen dem (naphth-1-yl)methylmodifizierten Strang **S08** und dem (naphth-1-yl)propylmodifizierten Hexamer **S09** (3,88 Minuten). Vergleicht man das (naphth-1-yl)methylmodifizierte Oligonucleotid **S08** mit dem 2-naphtoxymodifizierten Pendant **S11**, so erkennt man, dass durch den Austausch der Methylengruppe durch einen Sauerstoff die Retentionszeit um 2,86 Minuten abnimmt.

In Abbildung 8.17 sind die RP-HPLC-Profile der substituierten phenylalkylmodifizierten Hexamere abgebildet. Wie erwartet steigt die Retentionszeit signifikant von dem p-methylbenzylmodifizierten Oligomer **S14** mit 21,42 min zu dem p-(*t*-butyl)benzylmodifizierten Oligonucleotid **S16** mit 24,94 min im Vergleich zum benzylmodifizierten Pendant **S03** mit 19,92 Minuten an. Das p-(*t*-butyl)benzylmodifizierte Oligonucleotid **S16** weist nahezu die gleiche Retentionszeit auf wie der 4-phenylbutylmodifizierte Strang **S06**. Auch durch die Fluorsubstituenten kommt es zu einer Verlängerung der Retentionszeiten. Dieser Anstieg fällt mit circa 35 Sekunden pro Fluoratom jedoch

deutlich geringer aus als dies bei dem Methylsubstituenten beobachtet wurde. Die Einführung der Methoxygruppe (Oligonucleotid **S15**) führt ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Lipophilie im Vergleich zum benzylmodifizierten Pendant **S03**, ist jedoch geringer als im Falle des methylsubstituierten Stranges **S14**.

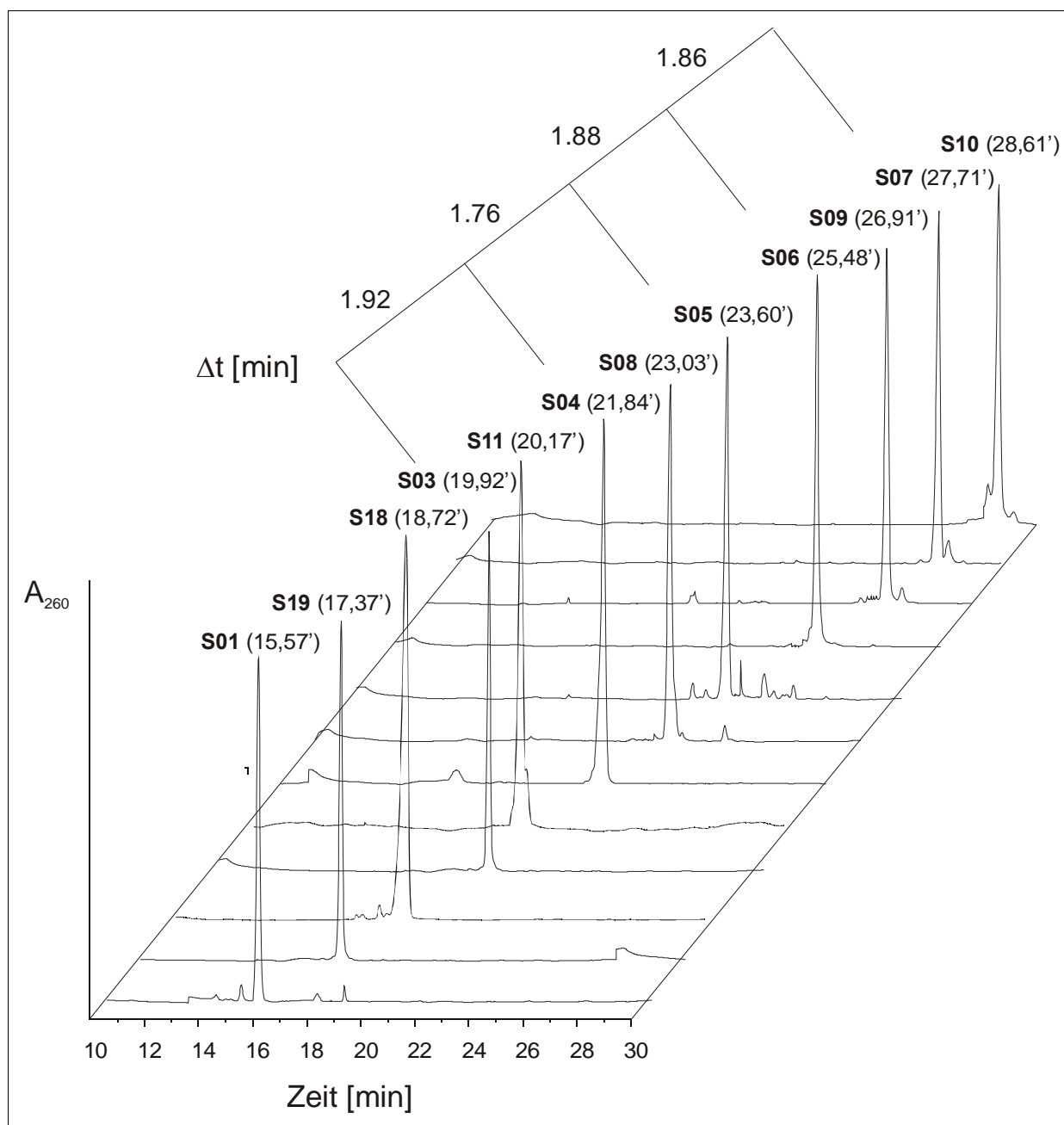


Abb. 8.16 Analytische RP-HPLC-Diagramme mit den entsprechenden Retentionszeiten der Sp-konfigurierten, arylalkylmodifizierten Hexamere. Die Retentionszeiten sind in Minuten angegeben.

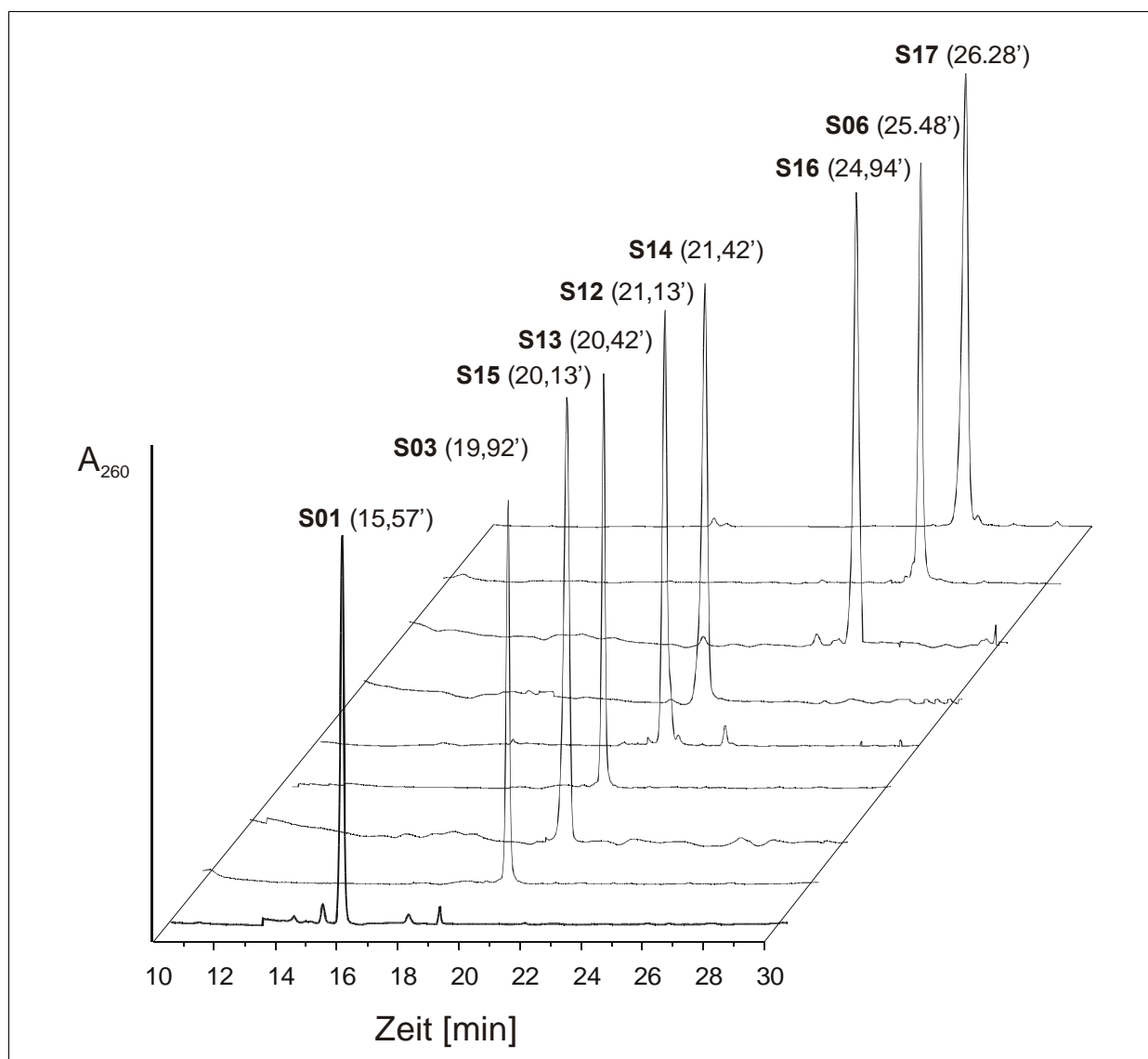


Abb. 8.17 Analytische RP-HPLC-Diagramme mit den entsprechenden Retentionszeiten der Sp-konfigurierten, substituierten phenylalkylmodifizierten Hexamere. Die Retentionszeiten sind in Minuten angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit der Einstellung der Lipophilie von Oligonucleotiden mittels Arylalkyl-Rückgratmodifikationen auf. Wie gezeigt ist es unter anderem möglich, durch Verlängerung der Alkylkettenlänge die Lipophilie in gezielten Schritten zu erhöhen. Auch durch Vergrößerung des Ringsystems konnte die Lipophilie in definierten Stufen gesteigert werden.

9 Bestimmung der absoluten Konfiguration

9.1 Methylphosphonat-Dimere

Im Rahmen früherer Arbeiten wurden alle 16 möglichen Methylphosphonat-Dimere synthetisiert, die Isomere getrennt und hinsichtlich ihrer absoluten Konfiguration hin mittels NMR, CD HPLC und Kristallisation untersucht. Aufgrund der erhaltenen Daten konnten empirische Regeln für die Zuordnung der absoluten Konfiguration aufgestellt werden. Zum einen besitzt, unabhängig von der stationären Phase einer chromatographischen Aufreinigungsmethode, das schneller eluierende Dimer stets die Rp-Konfiguration während das langsamer eluierende Dimer stets Sp-konfiguriert ist (Löschner, 1989a; Löschner, 1989b; Lebedev, 1993). Zum anderen weisen alle Rp-konfigurierten Methylphosphonat-Dimere – mit Ausnahme des 5'-d(Gp_{Me}A)-Dimers – die hochfeldigere chemische Verschiebung im ³¹P-NMR-Spektrum auf (Schell, 1998; Schweizer, 1998). Des weiteren zeigten bei Circular dichroismus-Untersuchungen alle rascher von der RP-HPLC-Säule eluierenden Isomere eine ausgeprägtere positive Elliptizität bei 280 nm als die langsamer eluierenden Sp-konfigurierten Pendants (Lebedev, 1993).

Neben der empirischen Zuordnung gelang der Nachweis der absoluten Konfiguration der 32 isomerenreinen Dimere durch Auswertung ihrer 2D-NMR-ROESY-Spektren (Löschner, 1990; Lebedev, 1993). Die Spektren wurden mit den vollständig geschützten Substanzen aufgenommen, um zu gewährleisten, dass die Beweglichkeit der Methylphosphonat-Dimere in dem Maße eingeschränkt ist, dass eine Konformation der gestapelten Basen angenommen werden kann. In Abhängigkeit der absoluten Konfiguration am Phosphor konnten charakteristische ROEs zwischen den homotopen Protonen der Methylgruppe und den Protonen der 2'-Desoxyribose-Ringe detektiert werden. Dabei wurden für die jeweils Rp-konfigurierten Isomere ROEs zwischen den homotopen Protonen der Methylgruppe und dem H4'- sowie H3'-Proton des 5'-Nucleosids erhalten. Bei den Sp-konfigurierten Isomeren fehlte das Kreuzsignal zwischen den Protonen der Methylgruppe und dem H4'-Proton oder war deutlich schwächer ausgeprägt als jenes zwischen dem H3'-Proton und der Methylgruppe. In Abbildung 9.1 ist dieser Sachverhalt nochmals graphisch aufgearbeitet.

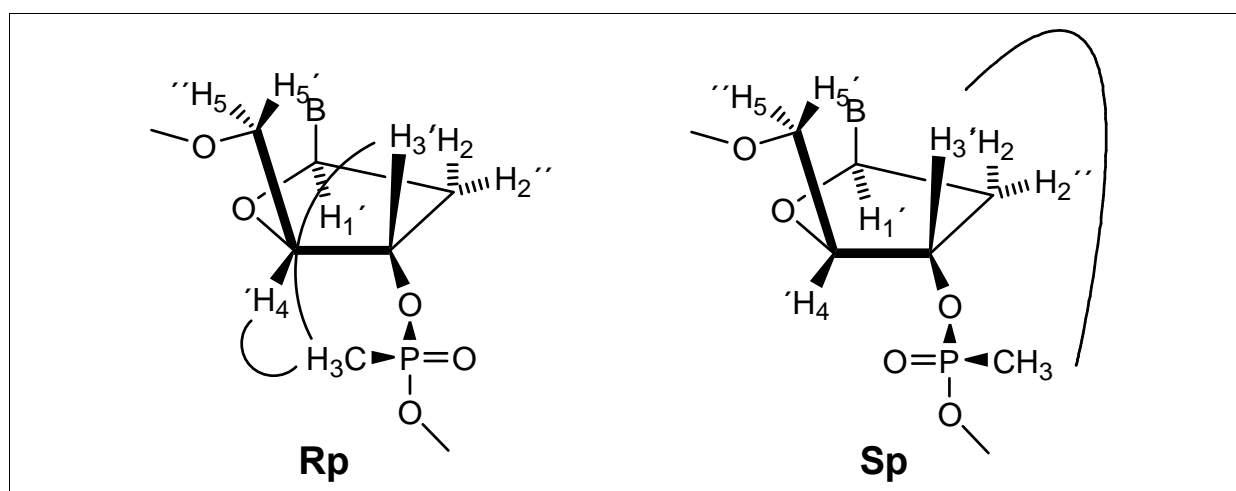


Abb. 9.1 Stereochemische Betrachtung für die Zuordnung der absoluten Konfiguration der Rp- und Sp-konfigurierten Diastereoisomere mittels 2D-ROESY-NMR.

In Abbildung 9.2 sind die relevanten Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR-Spektren für die Isomere des 5'-d(Ap_{Me}T)-Methylphosphonat-Dimers gezeigt. Der dargelegte Sachverhalt der unterschiedlichen Kreuzsignale ist dort sehr gut zu erkennen. Auch ist dort zu erkennen, dass im Falle von Signalüberlagerungen (vgl. Abb. 9.2 Signale von H3'(T) und H4'(A)) die Zuordnung erschwert wird. Bei einigen Dimeren wurden für beide Isomere Kreuzsignale zwischen den Protonen der Methylgruppe und dem H4'-Proton detektiert. In diesen Fällen wurden die Kreuzsignal-Intensitäten mittels Integration quantifiziert. Aus diesen Daten konnten die Abstände der Protonen bestimmt werden. Neben der visuellen

Auswertung konnte so über die erhaltenen Abstände, die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgen.

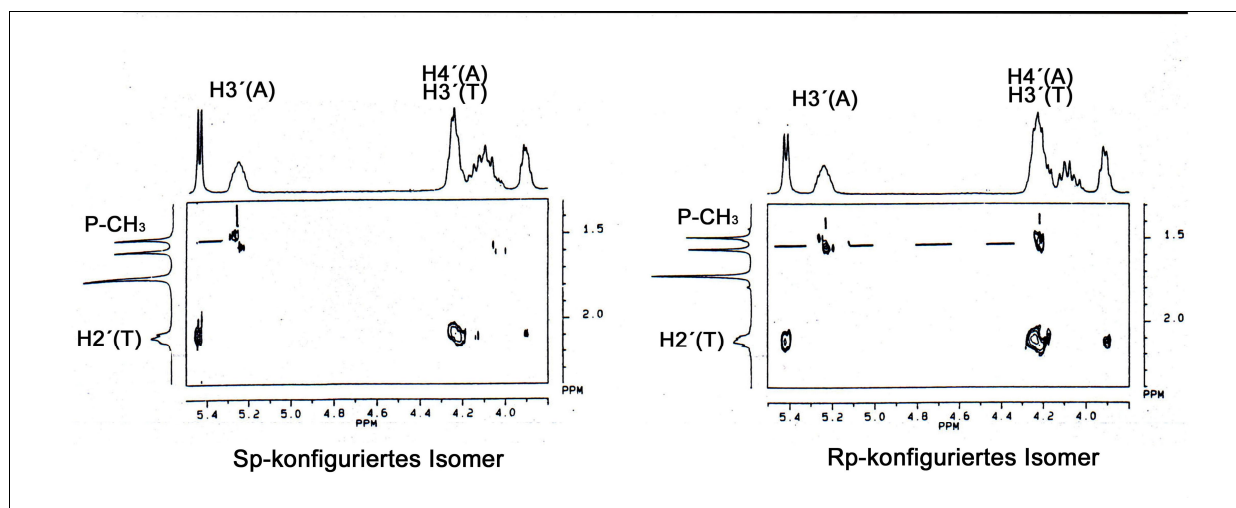


Abb. 9.2 Ausschnitte aus den 2D-ROESY-NMR-Spektren der Isomere des 5'-d(Ap_{Me}T)-Methylphosphonat-Dimere (Löschner, 1990)

Eine weitere Möglichkeit der Zuordnung der absoluten Konfiguration stellen Kristallstrukturen dar. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind jedoch nur drei der 32 möglichen Methylphosphonat-Dimere kristallisiert worden. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration mittels der 2D-NMR-ROESY-NMR-Spektroskopie und der empirischen Regeln wurden durch diese Kristalldaten bestätigt (Han, 1990; Stec, 1990; Chacko, 1983).

9.2 Zuordnung der absoluten Konfiguration bei 3-Phenylpropylphosphonat-Dimeren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung der absoluten Konfiguration anhand der 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere durchgeführt. Die Wahl fiel dabei auf die Sequenzen 5'-d(A_{3Pp}T) **135Rp/135Sp**, 5'-d(T_{3Pp}T) **136Rp/136Sp** und 5'-d(C_{3Pp}G) **137Rp/137Sp** (Abb. 9.3), da die analogen Methylphosphonate und Benzylphosphonate bereits untersucht wurden. Bei den Methylphosphonaten konnte die absolute Konfiguration

eindeutig zugeordnet werden (vgl. Kap. 9.1). Im Falle der Benzylphosphonate kam es aufgrund von Signalüberlagerungen zu Problemen bei der eindeutigen Zuordnung über die 2D-ROESY-NMR-Daten (Lehmann, 2001). Aus diesem Grund erfolgte die Zuordnung der absoluten Konfiguration über die empirischen Regeln.

Für die 2D-ROESY-NMR-Messungen der 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere kamen ebenfalls die vollständig geschützten Substanzen zum Einsatz um zu gewährleisten, dass die Beweglichkeit der Dimere eingeschränkt ist. Es wurden jedoch auch die voll entschützten CG-Dimere **142Rp** und **142Sp** untersucht. Dies hatte den Hintergrund, dass bei diesen Verbindungen keine Signalüberlagerungen der entscheidenden Protonen auftraten (vgl. Abb. 6.28). Die Synthese der 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere ist in Kap. 6.4.1 beschrieben.

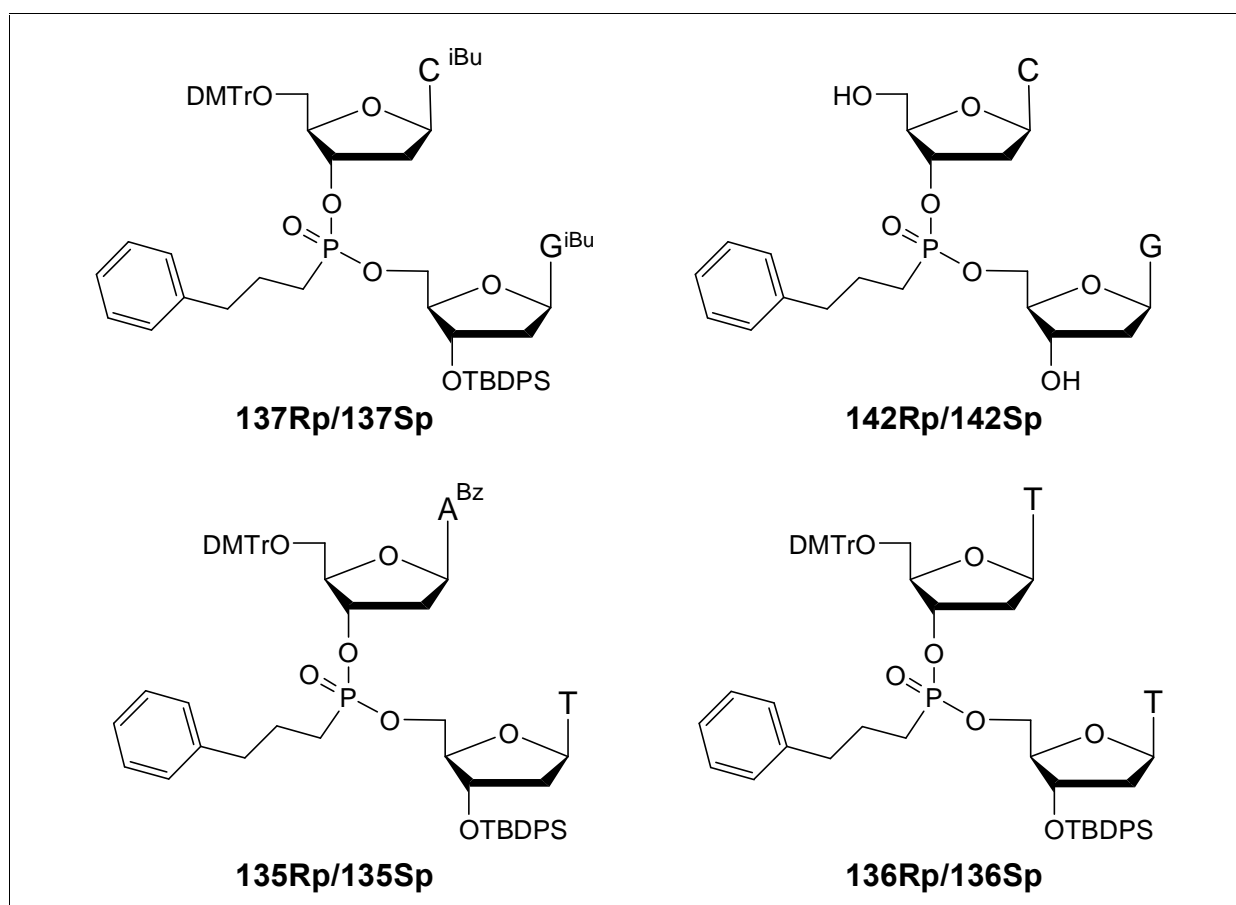


Abb. 9.3 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere für die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Modifikation.

9.2.1 Empirischen Regeln

Bei den Methylphosphonat-Dimeren konnte festgestellt werden, dass das rascher von der RP-HPLC-Säule eluierende Isomer Rp-konfiguriert ist. Diese Isomere zeigten bei ^{31}P -NMR-Messungen jeweils eine hochfeldigere chemische Verschiebung als die langsamer eluierenden, Sp-konfigurierten Pendants.

Die chemischen Verschiebungen der 3-Phenylpropylphosphonat- und Methylphosphonat-Dimere sind in Tabelle 9.1 wiedergegeben. Es ist zu erkennen, dass auch bei den 3-Phenylpropylphosphonat-Dimeren die schneller von der HPLC-Säule eluierenden Isomere eine hochfeldige Verschiebung im Vergleich zu den langsamer eluierenden Substanzen zeigen. Auffallend ist, dass die Unterschiede der chemischen Verschiebung zwischen den Isomeren der 3-Phenylpropylphosphonate signifikant geringer ausfällt als jene der entsprechenden Methylphosphonate.

Trotz dieses Unterschiedes kann die Zuordnung der absoluten Konfiguration von den Methylphosphonaten auf die 3-Phenylphosphonate übertragen werden. Dies bedeutet, dass das rascher von der HPLC-Säule eluierende Isomer Rp-konfiguriert und das langsamer eluierende Isomer Sp-konfiguriert ist.

Tab. 9.1 Chemische ^{31}P -NMR-Verschiebungen der isomerenreinen 3-Phenylpropylphosphonat- und Methylphosphonat-Dimere.

3-Phenylpropylphosphonat-Dimere			
Nr.	Dimer	Rp [ppm] (schnell)	Sp [ppm] (langsam)
135	5'-d(A _{3Pp} T)	33,86	34,21
136	5'-d(T _{3Pp} T)	33,87	34,38
137	5'-d(C _{3Pp} G)	34,01	34,34
Methylphosphonat-Dimere (Schell, 1998)			
---	5'-d(A _{Me} T)	31,68	32,46
---	5'-d(T _{Me} T)	31,73	32,58
---	5'-d(C _{Me} G)	31,39	33,37

9.2.2 2D-ROESY-NMR-Messungen

Um die empirische Zuordnung der absoluten Konfiguration abzusichern, wurden die 3-Phenylpropylphosphonate 2D-ROESY-NMR spektroskopisch untersucht. Die Durchführung erfolgte in Analogie zu den Methylphosphonat-Dimeren (Löschner, 1990; Lebedev, 1993; Schell, 1998).

Die Spektren wurden von allen acht synthetisierten Verbindungen aufgenommen. Die Dimere wurden in (d₆)-DMSO gelöst und an einem AMX600-Spektrometer der Firma Bruker vermessen. Die exakte Zuordnung der einzelnen Protonen erfolgte durch die entsprechenden ¹H,¹H-COSY-NMR-Spektren.

Bei der folgenden Diskussion der Ergebnisse wird nur auf die für die Zuordnung der absoluten Konfiguration entscheidenden Kreuzsignale eingegangen. Dabei handelt es sich um das jeweilige H3'- und H4'-Proton des 5'-Nucleosids und um die drei CH₂-Gruppen der 3-Phenylpropyl-Gruppe. Die drei Methylengruppen werden bei der weiteren Betrachtung mit α, β, γ abgekürzt [C₆H₅-CH₂(γ)-CH₂(β)-CH₂(α)-P]. Die relevanten Ausschnitte aus den ROESY-Spektren sind in den Abbildungen 9.4, 9.5, 9.6 und 9.7 wiedergegeben.

Für die Kalkulation der Protonenabstände wurden die Kreuzsignale integriert. Aus den erhaltenen Daten kann ein unbekannter Protonenabstand (r(u)) unter Zuhilfenahme eines bekannten Abstandes (r(k)) nach folgender Beziehung berechnet werden:

$$[9-1] \quad R(k)/R(u) = [r(u)/r(k)]^6$$

Der Wert des H2'-H2''-Kreuzsignals des 5'-Nucleosids wurde als Referenzdistanz gewählt. Der Abstand zwischen diesen beiden Protonen wurde auf 1,78 Å festgelegt (Löschner, 1990; Van de Ven, 1988). Im Falle der Dimere **137Rp** und **137Sp** konnte das Kreuzsignal der H2'-H2''-Protonen aufgrund von Signalüberlagerungen nicht exakt integriert werden. Aus diesem Grund wurde dort der Abstand der H5-H6-Protonen des Cytidins gewählt. Der Abstand wurde auf 2,59 Å festgelegt (Kan, 1993; Van de Ven, 1988). Diese Methode der Abstandsbestimmung ist mit einer Fehlergrenze von ±10% hinreichend genau.

2D-ROESY-NMR-Spektren der Dimere **135Rp** und **135Sp**

Die berechneten Abstände der Protonen für die Bestimmung der absoluten Konfiguration sind in Tabelle 9.2 wiedergegeben. Die Ausschnitte aus den ROESY-NMR-Spektren sind in Abbildung 9.4 gezeigt. Betrachtet man den Ausschnitt aus dem Spektrum des rascher eluierenden Isomers **135Rp** (Abb. 9.4a), so erkennt man deutliche Kreuzsignale zwischen dem H3'-Proton des Adenosins und den Methylenprotonen der 3-Phenylpropylgruppe. Die entsprechenden Kreuzsignale des H4'-Protons mit den Methylenprotonen erscheinen in vergleichbarer Intensität. Bei dem langsamer eluierenden Isomer **135Sp** (Abb. 9.4b) sind ebenfalls starke Signale zwischen dem H3'-Proton und den Methylenprotonen zu erkennen. Die Kreuzsignale, die zwischen dem H4'-Proton und den Methylenprotonen beobachtet werden, sind hingegen deutlich schwächer ausgeprägt. Diese visuellen Beobachtungen werden durch die berechneten Abstände bestätigt. Im Falle des Dimers **135Sp** sind die Abstände zwischen dem H3'-Proton und den Methylenprotonen signifikant geringer als jene zwischen dem H4'-Proton und den jeweiligen CH₂-Gruppen. Da sich die Kreuzsignale H3'-CH₂(α) und H3'-CH₂(β) sowie H4'-CH₂(α) und H4'-CH₂(β) der Verbindung **135Rp** überlagern, konnten die Abstände der einzelnen Protonen nicht ermittelt werden. Um trotzdem eine Aussage über die Konformation treffen zu können wurden die Signale zusammen integriert und die erhaltenen Daten miteinander verglichen. Da sich dabei annähernd der gleiche Wert zwischen dem H3'- und H4'-Proton zu den Methylenprotonen ergibt kann davon ausgegangen werden, dass die Abstände nahezu identisch sind.

Tab. 9.2 Berechnete Protonenabstände für die untersuchten 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere **135Rp** und **135Sp**. Beschriftung der Methylengruppen α, β, γ: C₆H₅-CH₂(γ)-CH₂(β)-CH₂(α)-P; Rp= rascher- Sp= langsamer von der HPLC-Säule eluierendes Isomer, *=kein Abstandwert, Summe aus zwei Kreuzsignalen.

3-Phenylpropylphosphonat-Dimer 5'-d(A _{3Pp} T), Abstände in Å						
	H3'(A)-α	H3'(A)-β	H3'(A)-γ	H4'(A)-α	H4'(A)-β	H4'(A)-γ
135Rp	(2,49)*		3,73	(2,51)*		3,69
135Sp	3,02	2,86	3,51	3,75	3,52	4,13

Die ermittelten Ergebnisse stehen in Analogie zu jenen, die für die entsprechenden Methylphosphonate erhalten wurden (Kap. 9.1) und bestätigen zudem die empirische Zuordnung der absoluten Konfiguration. Aus diesem Grund ist das von der HPLC-Säule

rascher eluierende Isomer **135Rp** Rp-konfiguriert und das langsamer eluierende Isomer **135Sp** Sp-konfiguriert.

2D-ROESY-NMR-Spektren der Dimere 136Rp und 136Sp

Auch im Falle der 3-phenylpropylmodifizierten Dimere 5'-d(T_{3Pp}T) **136Rp** und **136Sp** bestätigen die ermittelten Protonen-Abstandswerte die empirische Bestimmung sowie die bei den Methylphosphonat-Dimeren getroffene Zuordnung der absoluten Konfiguration. Die für das rascher von der HPLC-Säule eluierenden Isomer berechneten Abstände zwischen dem H3'-Proton und den Methylenprotonen sind nahezu identisch mit den Abständen zwischen dem H4'-Proton und den entsprechenden CH₂-Gruppen (Tab. 9.3). Das langsamer eluierende Isomer zeigt hingegen zwischen dem H4'-Proton und den Methylenprotonen einen deutlich größeren Abstand als zwischen dem H3'-Proton und den Methylenprotonen. Der durch die Abstandbestimmung dargelegte Sachverhalt ist auch gut anhand der in Abbildung 9.5 dargestellten Spektren ersichtlich.

Tab. 9.3 Berechnete Protonenabstände für die untersuchten 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere **136Rp** und **136Sp**. Beschriftung der Methylengruppen α , β , γ : C₆H₅-CH₂(γ)-CH₂(β)-CH₂(α)-P; Rp= rascher Sp= langsamer von der HPLC-Säule eluierendes Isomer, n.b.= nicht bestimmbar

3-Phenylpropylphosphonat-Dimer 5'-d(T _{3Pp} T), Abstände in Å						
	H3'(T5')- α	H3'(T5')- β	H3'(T5')- γ	H4'(T5')- α	H4'(T5')- β	H4'(T5')- γ
136Rp	3,24	2,99	n.b.	3,32	3,05	n.b.
136Sp	3,10	3,05	n.b.	3,41	3,49	n.b.

2D-ROESY-NMR-Spektren der Dimere 137Rp und 137Sp

Aufgrund zahlreicher Signalüberlagerungen konnten die Abstände bei den Dimeren **137Rp** und **137Sp** nicht exakt bestimmt werden. Die überlagerten Kreuzsignale der Methylengruppen α und β mit dem H3'-Proton bzw. H4'-Proton wurden trotzdem, wie im Falle des Dimers **135Rp**, integriert. Die erhaltenen Werte passen in das Zuordnungsmuster zur Bestimmung der absoluten Konfiguration. Der erhaltene Wert zwischen dem H3'-Proton und den Methylengruppen α und β ist im Falle des rascher eluierenden Isomers **137Rp** identisch zu dem für das H4'-Proton und den Methylengruppen α und β bestimmten Wert. Bei dem langsamer eluierenden Isomer

137Sp wurde zwischen dem H4'-Proton und den CH₂-Gruppen α und β ein signifikant größerer Wert ermittelt als zwischen dem H3'-Proton und den Methylengruppen.

Bei der Betrachtung der entsprechenden Spektren (Abb. 9.6 a und b) ist dieser Sachverhalt sehr gut zu erkennen.

Tab. 9.4 Berechnete Protonenabstände für die untersuchten 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere **137Rp** und **137Sp**. Beschriftung der Methylengruppen α , β , γ : C₆H₅-CH₂(γ)-CH₂(β)-CH₂(α)-P; Rp= rascher- Sp= langsamer von der HPLC-Säule eluierendes Isomer, *= kein Abstandswert, Summe aus zwei Kreuzsignalen; n.b.= nicht bestimmbar.

3-Phenylpropylphosphonat-Dimer 5'-d(C _{3Pp} G), voll geschützt, Angaben in Å						
	H3'(C)- α	H3'(C)- β	H3'(C)- γ	H4'(C)- α	H4'(C)- β	H4'(C)- γ
137Rp	(2,44)*		n.b.	(2,37)*		n.b.
137Sp	(2,35)*		n.b.	(2,84)*		n.b.

Um die Signalüberlagerungen zu reduzieren, wurden die Dimere **137Rp** und **137Sp** vollständig entschützt. Bei den erhaltenen Verbindungen **142Rp** und **142Sp** kam es bei den relevanten Protonen zu keinen Signalüberlagerungen. Aus diesem Grund wurde von diesen Verbindungen ebenfalls die 2D-ROESY-NMR-Spektren aufgenommen.

2D-ROESY-NMR-Spektren der Dimere 142Rp und 142Sp

Im Falle der voll entschützten Dimere **142Rp** und **142Sp** konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Abständen des Sp- und Rp-konfigurierten Isomers ermittelt werden. Grund hierfür dürfte die größere Beweglichkeit der entschützten Dimere im Vergleich zu den entsprechenden geschützten Dimeren sein.

Tab. 9.5 Berechnete Protonenabstände für die untersuchten 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere **142Rp** und **142Sp**. Beschriftung der Methylengruppen α , β , γ : C₆H₅-CH₂(γ)-CH₂(β)-CH₂(α)-P; Rp= rascher Sp= langsamer von der HPLC-Säule eluierendes Isomer, n.b. = nicht bestimmbar

3-Phenylpropylphosphonat-Dimer 5'-d(C _{3Pp} G), voll entschützt, Abstände in Å						
	H3'(C)- α	H3'(C)- β	H3'(C)- γ	H4'(C)- α	H4'(C)- β	H4'(C)- γ
142Rp	3,33	2,96	n.b.	3,41	3,06	n.b.
142Sp	3,38	3,0	n.b.	3,51	3,09	n.b.

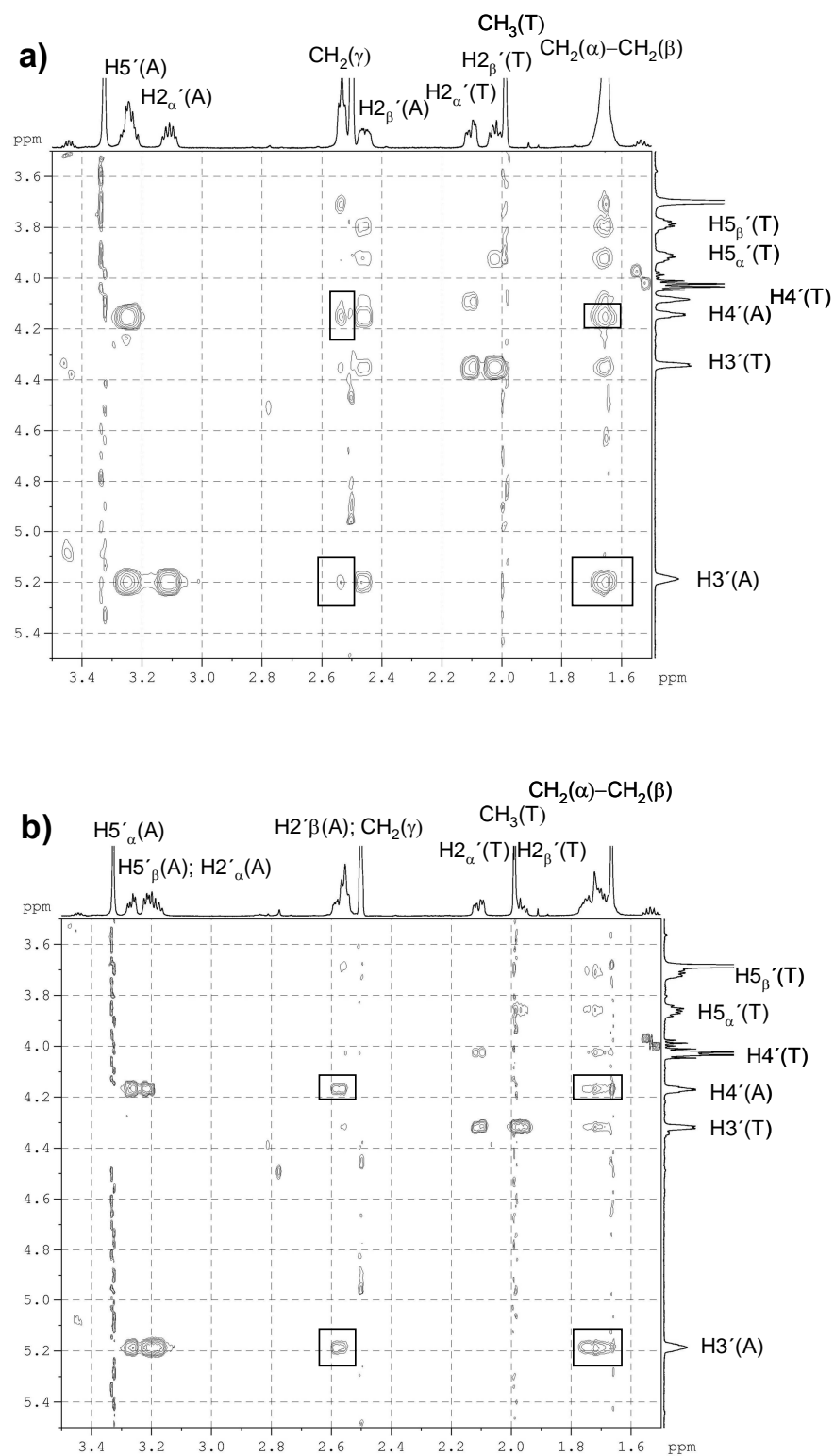


Abb. 9.4 Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR-Spektren der 3-phenylpropylmodifizierten Dimere 5'-(A₃PpT), a) rascher eluierendes Isomer **135Rp**, b) langsamer eluierendes Isomer **135Sp**.

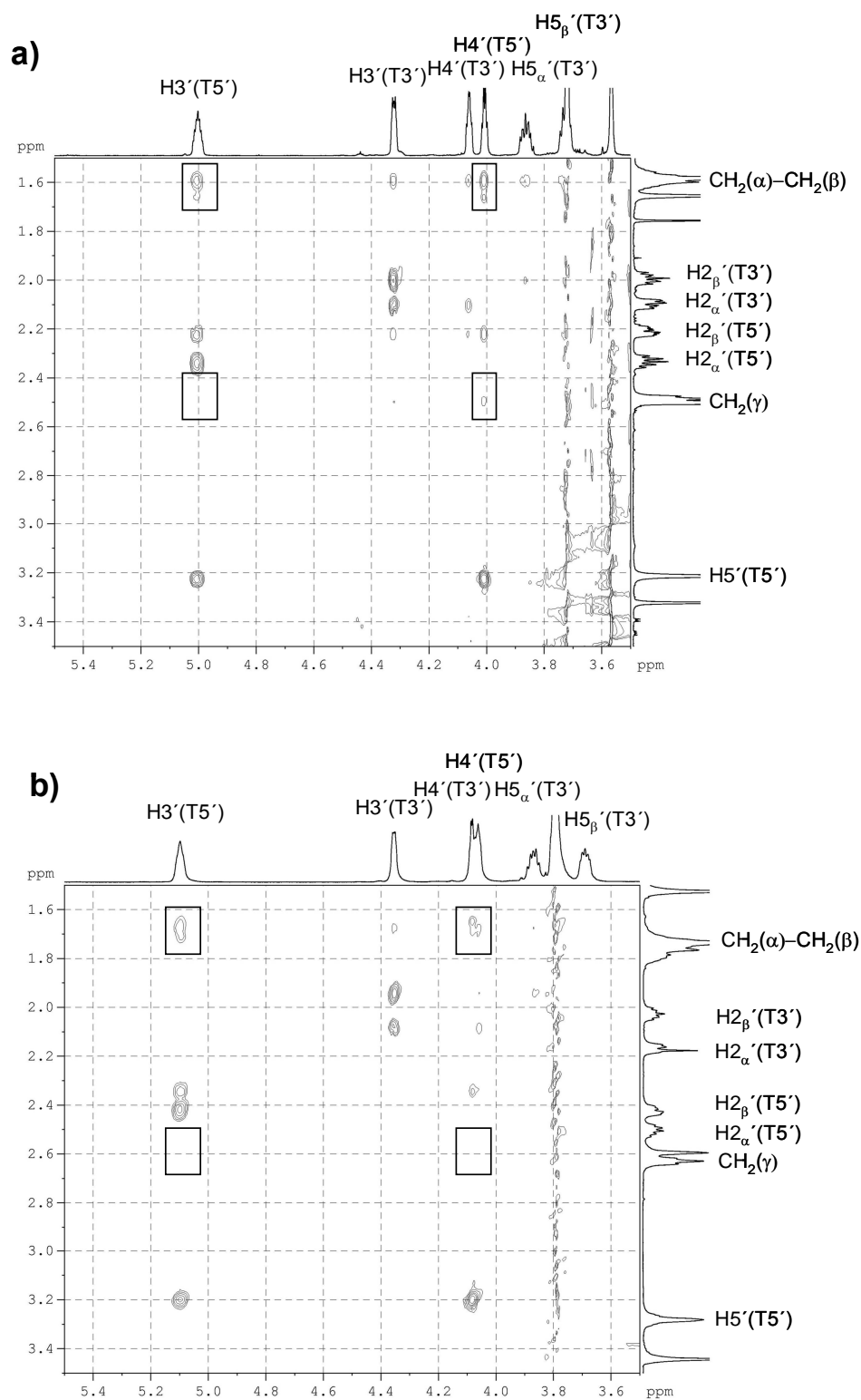


Abb. 9.5 Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR-Spektren der 3-phenylpropylmodifizierten Dimere 5'-(T_{3pp}T), a) rascher eluierendes Isomer **136Rp**, b) langsamer eluierendes Isomer **136Sp**.

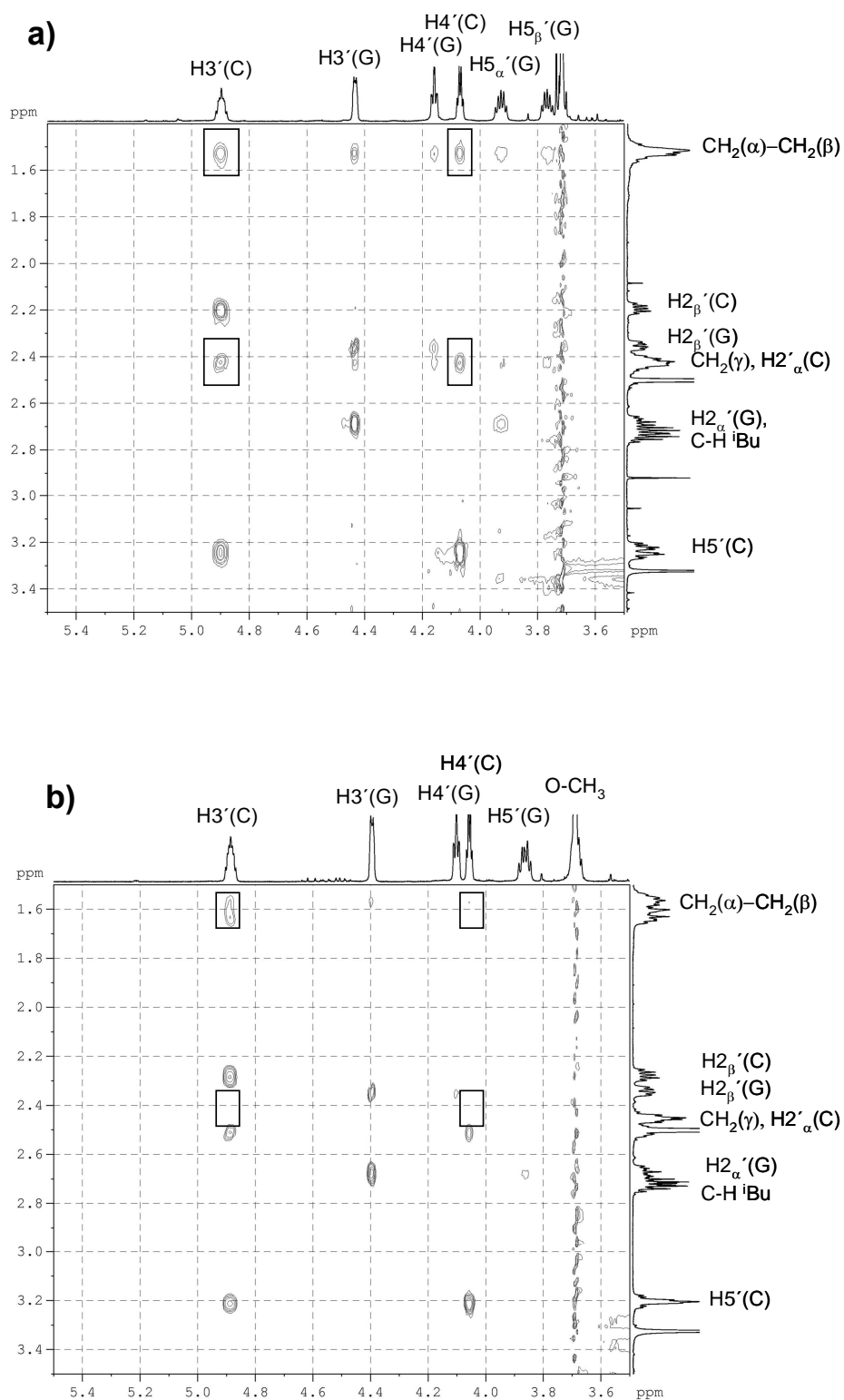


Abb. 9.6 Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR-Spektren der 3-phenylpropylmodifizierten Dimere 5'-(C₃PpG), a) rascher eluierendes Isomer **137Rp**, b) langsamer eluierendes Isomer **137Sp**.

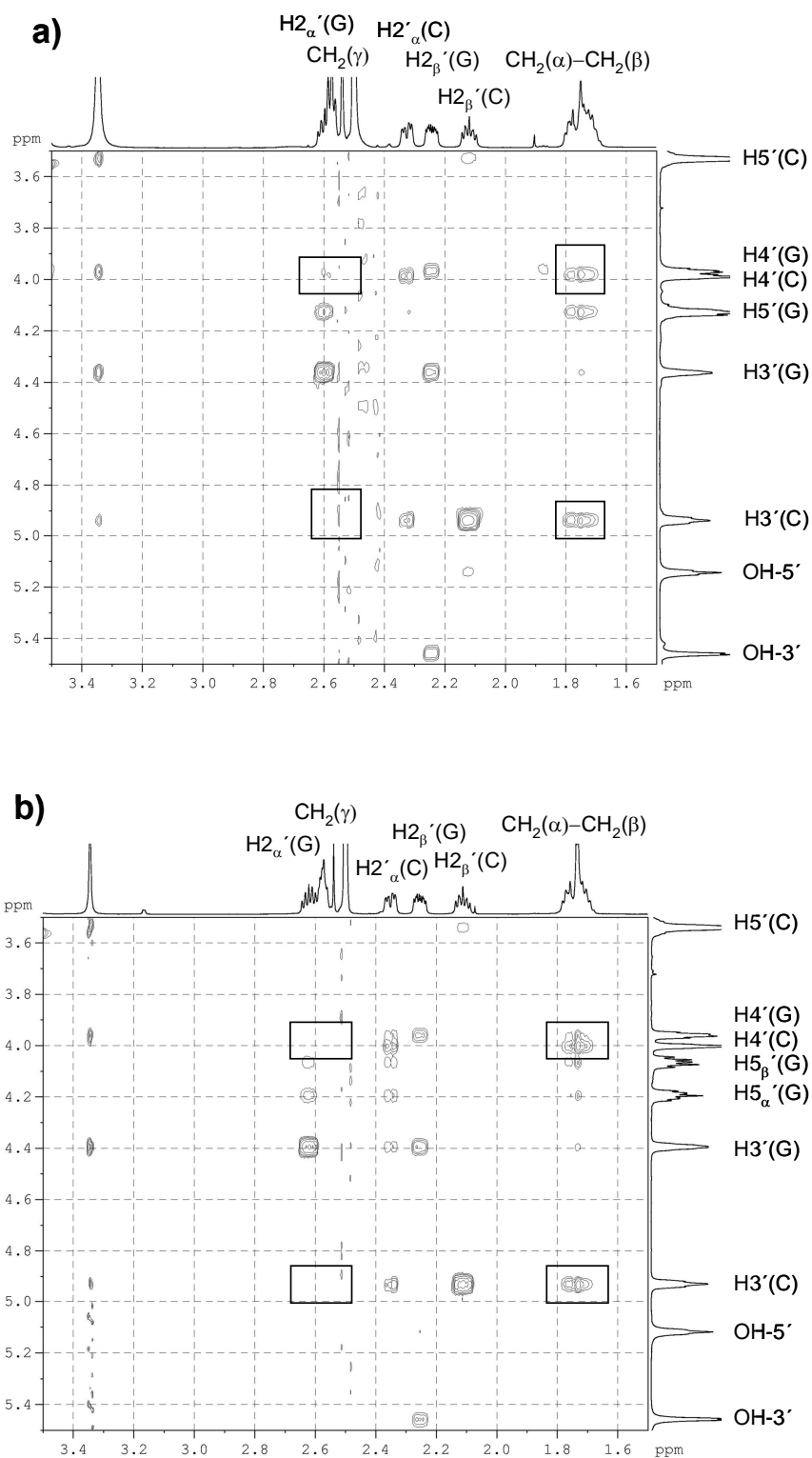


Abb. 9.7 Ausschnitte der 2D-ROESY-NMR-Spektren der 3-phenylpropylmodifizierten Dimere 5'-(C_{3Pp}G), a) rascher eluierendes Isomer **142Rp**, b) langsamer eluierendes Isomer **142Sp**.

10 Antisense- Oligonucleotide gegen HCV

10.1 Zielsequenz / Bisherige Resultate

Die zellfreien sowie die Zellkultur *in vitro*-Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Caselmann, Dr. Alt (MPI München-Martinsried) und Dr. Serve vom Universitätsklinikum Bonn durchgeführt. Als Zielregion diente die 5'-nicht codierende Region des Hepatitis C Virus (vgl. Kap. 4.2). Die Antisense-Oligonucleotide wurden dabei gegen die stark gefaltete Domäne IV gerichtet. Zu den ersten Arbeiten auf diesem Gebiet zählte die Entwicklung eines *in vitro* und *in vivo* effektiv wirkenden 23mer Vollthioats, das gegen die Nucleotide 326-348 des RNA-Genoms des HCV (Typ 1b) gerichtet war (Alt, 1997; Alt, 1995). Legt man den Sekundärstrukturvorschlag von Honda zugrunde (Abb. 10.1), so hybridisiert diese Sequenz mit ihrem 3'-Ende im Bereich eines Pseudoknotens, während das 5'-Ende eine Hairpin-Struktur mit einem Stamm aus fünf Basenpaaren und einer sieben Nucleotide beinhaltenden Schleife überlagert (Honda, 1999; Honda, 1996). Diese Schleife ist die einzige längere Einzelstrangregion in diesem Bereich der Virussequenz und enthält zudem das AUG-Startcodon für die

Proteinbiosynthese des Polyproteinprecursors. Die dreidimensionale Struktur dieser Region dient dem Virus als IRES.

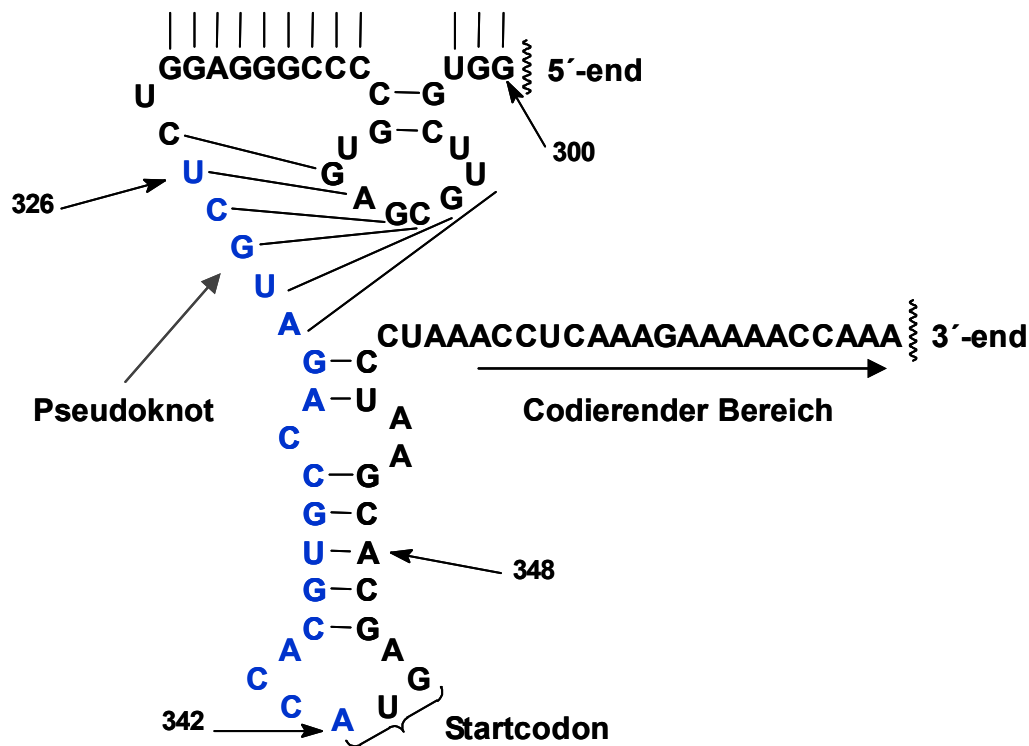


Abb. 10.1 Ausschnitt aus dem Sekundärstrukturmodell der 5'-NCR des Hepatitis C Virus (Honda, 1999; Honda, 1996). Gegen die blau markierte Sequenz wurden im Rahmen dieser Arbeit die Antisense-Oligonucleotide gerichtet.

Im folgenden wurden die Art und Anzahl der Phosphatrückgrat-Modifikationen in dieser Sequenz variiert. Neben den polaren Phosphorthioaten wurden nicht polare methyl- und benzylmodifizierte Antisense-Oligonucleotide synthetisiert. Die Anzahl der Modifikationen wurde auf sechs je 23mer reduziert, die sowohl über die Sequenz verteilt, als auch terminal (je drei am 5'- bzw. 3'-Ende) positioniert waren. Die Oligonucleotide zeigten eine hohe Stabilität gegenüber 3'-Exonucleasen und wiesen gegenüber den komplementären DNA- und RNA-Zielsequenzen eine ausreichend hohe Duplexstabilität auf. Erwartungsgemäß zeigten die terminal modifizierten Oligonucleotide, die 16 aufeinanderfolgende, unmodifizierte Phosphordiesterbindungen enthielten, im Heteroduplex (DNA/RNA) eine deutlich stärkere Aktivierung der RNase H als die vollmodifizierten Phosphorthioate und die Oligonucleotide, die über die Sequenz verteilt modifiziert waren. Zudem konnte für die Methyl- und Benzylphosphonate eine Erhöhung ihrer Lipophilie im Vergleich zu den Phosphorthioaten festgestellt werden (Alt, 1999;

Caselmann, 1997). Für alle modifizierten Antisense-Oligonucleotide konnte in einem zellfreien *in vitro* Translations-Assay eine hyperbolische, dosisabhängige Inhibierung gefunden werden, wobei die Oligonucleotide mit den über die Sequenz verteilten Modifikationen bei niedrigen Konzentrationen deutlich schwächer wirkten. Die maximale Inhibierung im Falle der 23mere lag bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 μM bei $80,4\% \pm 1,9\%$ für das terminal modifizierte Phosphorthioat und bei $87,0\% \pm 3,7\%$ für das terminal modifizierte Benzylphosphonat. Auch in *in vitro* Zellkultur-Experimenten mit HepG2 Zellen zeigten die Antisense-Oligonucleotide eine deutliche Inhibierung der HCV-Genexpression (Caselmann, 2000; Alt, 1999). In folgenden Arbeiten wurde die Sequenz des 23mers sukzessive in Schritten von je drei Nucleotiden verkürzt. Die terminal modifizierten Phosphorthioate wurden *in vitro* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bis zu einer Sequenzlänge von 17 Nucleotiden keine Abnahme der Inhibierung festzustellen ist (Abb. 10.2). Eine Verkürzung der Sequenzlänge auf 16 bzw. 14 Nucleotide führt jedoch zu einer signifikanten Verschlechterung der Inhibierung (Lehmann, 2001).

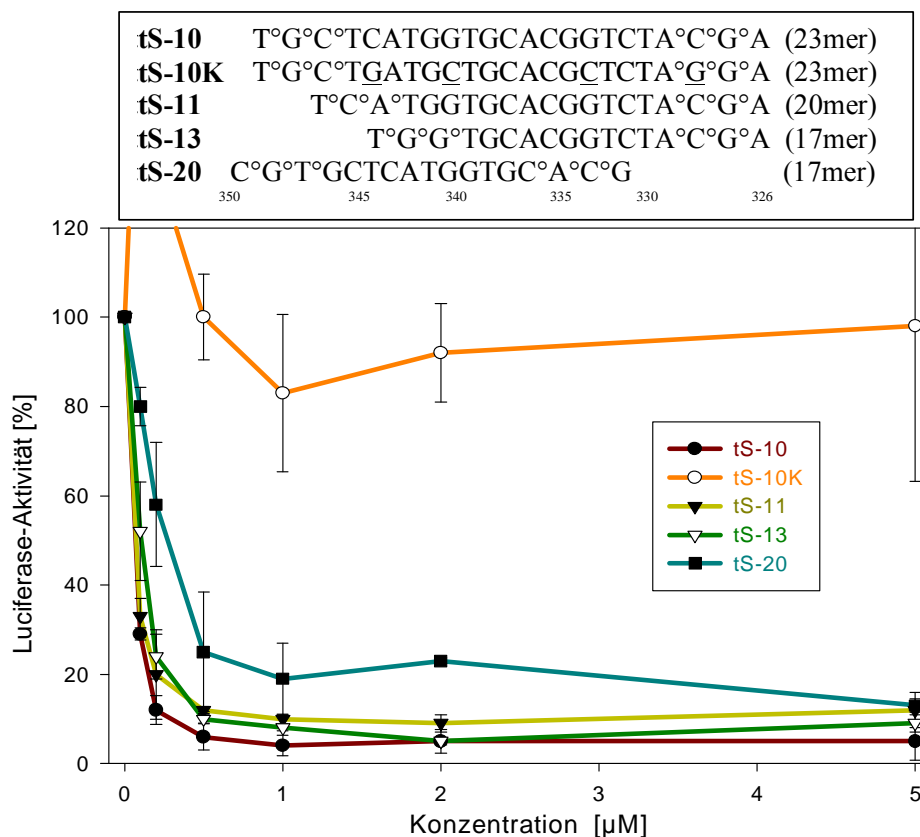


Abb. 10.2 Vergleich der Inhibierung (zellfreier *in vitro*-Assay) der HCV-Genexpression durch

23mer-, 20mer- und 17mer Phosphorthioat Antisense-Oligonucleotide.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen mit 17mer Oligonucleotiden durchgeführt, die gegen die Nucleotide 342-326 des Hepatitis C Virus gerichtet waren. Die phosphorthioat- und benzylmodifizierten 17mere **tS-13** und **tB-13** wurden ebenfalls in einem Zellkultur-Translations-Assay untersucht. Dabei wurde bei einer Konzentration von 4 μM nach 24 Stunden eine maximale Inhibierung von 81% für das Phosphorthioat **tS-13** und 71% für das Benzylphosphonat **tB-13** gefunden (Abb. 10.3). Die Inhibierung lag sogar über den Werten, die für die 23mer Oligonucleotide erzielt wurden. Zudem war die Inhibierung im Vergleich zu den „Mismatch“-Kontrollen **tS-13K** und **tB-13K** hochspezifisch (Lehmann, 2001).

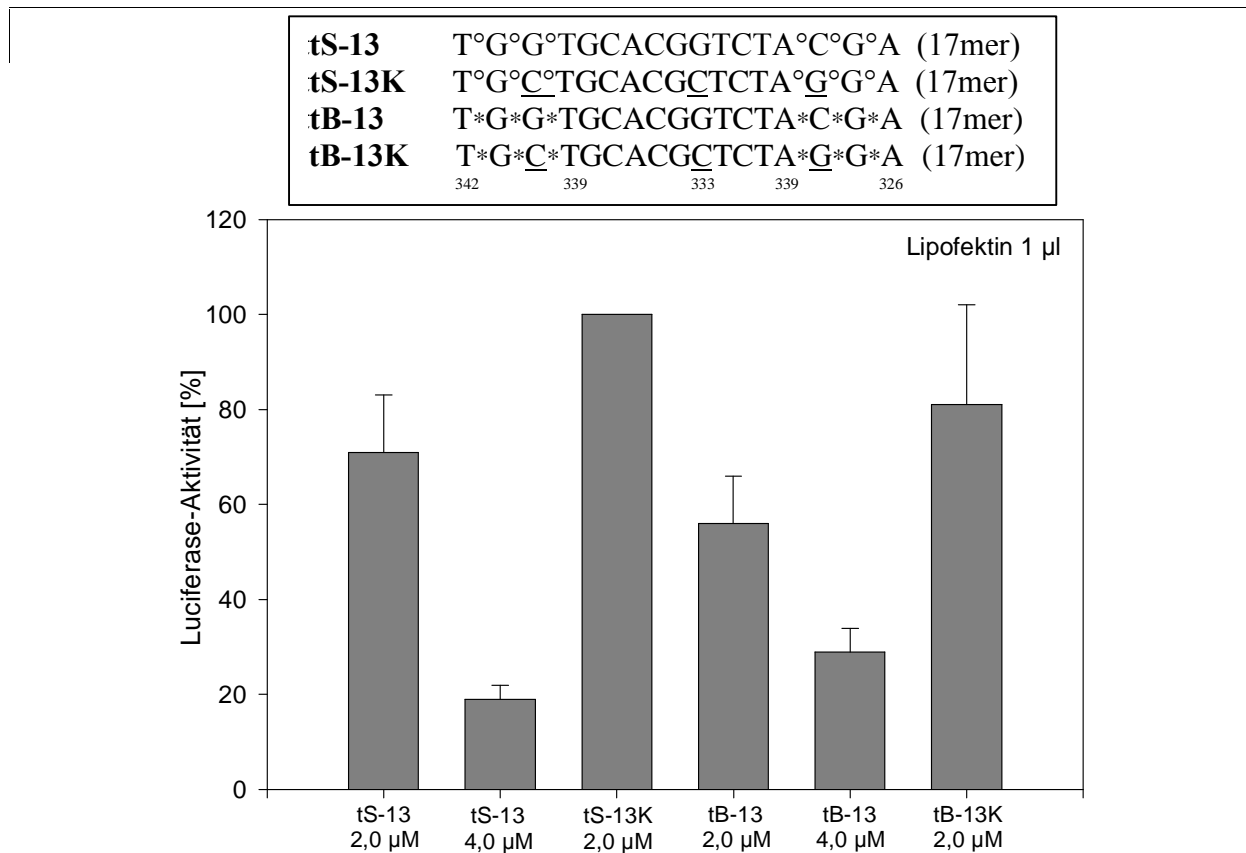


Abb. 10.3 Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferse Fusionsgens nach 24 Stunden im Zellkultur-Translations-Assay (HepG2-Zellen). °=Phosphorthioat, *=Benzylphosphonat, K="Mismatch"-Kontrolle

Aufgrund der sehr guten Inhibitionsraten, Hybridisierungseigenschaften, Lipophilieerhöhung, Nucleasestabilität sowie der sehr hohen Spezifität der benzylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide im Vergleich zu den Phosphorthioaten und Methyl-

phosphonaten sollten im Rahmen dieser Arbeit neue, lipophilere Rückgratmodifikationen synthetisiert und getestet werden. Durch die Erhöhung der Lipophilie sollte eine bessere zelluläre Aufnahme und somit eine bessere Inhibitionsrate erzielt werden. Durch die vorliegenden Ergebnisse wurden als Zielsequenz die 17 Nucleotide 342-326 der 5'-nicht codierenden Region des Hepatitis C Virus gewählt. Die Antisense-Oligonucleotide wurden dabei sechsfach terminal modifiziert (je drei Modifikationen am 3'-bzw. 5'-Ende). Es wurde das 2-Phenylethylphosphonat **S54**, 4-Phenylbutylphosphonat **S55** und das 2,4-Difluorbenzylphosphonat **S56** synthetisiert. Zum Vergleich der Daten wurden zusätzlich das Phosphorthioat **S57** und das Benzylphosphonat **S53** synthetisiert. Die Oligonucleotide **S57** und **S53** sind identisch mit den bereits getesteten Strängen **tS-13** und **tB-13**. Die Synthese der 17mer Antisense-Oligonucleotide ist in Kapitel 7 ausführlich beschrieben. Auch sollte getestet werden inwieweit sich die gewählte Zielsequenz auch für die Inhibierung mittels RNAi geeignet. Aus diesem Grund wurden die 21mer RNA-Oligonucleotide **S59-S61** synthetisiert. Jeder Strang besitzt am 3'-Ende einen Überhang von zwei Thyminiden. Die 21mere sind gegen die Nucleotide 346-326 der 5'-NCR des Hepatitis C Virus gerichtet. Der Duplex **S59-S60** sowie die „Mismatch“-Kontrolle **S60-S61** sollten *in vitro* sowie in Zellkultur getestet werden. Die Inhibierungsversuche sind jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

10.2 T_m-Werte der Antisense-Oligonucleotide

Ein Kriterium für Antisense-Oligonucleotide ist die Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz. Dies ist eine zwingende Voraussetzung für die Wirkung eines Antisense-Oligonucleotids durch die physische Blockade der Ziel-RNA oder für die Aktivierung der RNase H (vgl. Kap. 2.3.2). Über die Bestimmung der T_m-Werte lässt sich zeigen, ob ein Oligonucleotid in isotonischer Pufferlösung bei der Körpertemperatur eines Säugers einen stabilen Duplex ausbilden kann. Außerdem zeigen die Schmelzpunkte auf, welchen Einfluss die eingeführten Rückgratmodifikationen auf die Stabilität der Duplexe besitzen.

Die Aufnahme der UV-Schmelzkurven erfolgte, wie bei den einfach modifizierten Oligonucleotid-Duplexen, an einem Zweistrahl UV/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der

Firma Varian. Die Messungen wurden ebenfalls in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), der 140 mM NaCl enthielt, durchgeführt. Es wurde mit einer Einzelstrangkonzentration von 3 μ M gearbeitet. Aufgrund der Sechsfachmodifizierung kam es zu einer größeren Schwankungsbreite der ermittelten T_m -Werte von $\pm 1,0^\circ\text{C}$. Die Antisense-Oligonucleotide wurden sowohl mit dem komplementären sense-DNA- **S51** als auch mit den sense-RNA-Strang **S52** hybridisiert. Die erhaltenen T_m -Werte sind in Tabelle 10.1 wiedergegeben.

Im Falle der DNA/DNA-Hybride zeigt der benzylmodifizierte Duplex **S51-S53** einen um $1,3^\circ\text{C}$ niedrigeren T_m -Wert als der unmodifizierte Doppelstrang **S50-S51**. Durch das Gemisch aus Rp- und Sp-konfigurierten Modifikationen kommt es nicht wie bei einfach modifizierten, Rp-konfigurierten Benzylphosphonaten zu einer T_m -Wert-Erhöhung. Der 2-phenylethylmodifizierte Oligonucleotid-Duplex **S51-S53** weist eine etwas stärkere T_m -Wert-Erniedrigung von $3,7^\circ\text{C}$ auf. Dies liegt jedoch immer noch im Bereich des Phosphorthioat-Duplexes **S51-S57**, der einen Schmelzpunkt von $62,5^\circ\text{C}$ aufweist. Die nach den Resultaten der einfach modifizierten 2-Phenylphosphonate und 4-Phenylphosphonate zu erwartende deutliche Erniedrigung der Schmelzpunkte trat jedoch nicht ein. Ein Grund hierfür dürfte sein, dass die Modifikationen an den Enden der Oligonucleotide eingeführt sind. Dies führte bei Modifikationen mit längeren Alkylketten im Falle der einfach modifizierten Dodecamere zu stabileren Duplexen als jene die mittig modifiziert waren (vgl. Kap. 8.1.2).

Tab. 10.1 T_m -Werte der unterschiedlich modifizierten Antisense-Oligonucleotide nach der Hybridisierung mit der DNA- bzw. RNA-Zielsequenz **S51** und **S52**. Gemessen in Phosphatpuffer (10 mM Phosphat, 140 mM NaCl, pH 7,0), Einzelstrangkonzentration: 3 μ M, Fehlergrenze: $\pm 1,0^\circ\text{C}$

Nr.	Antisense-Oligonucleotide	sense-DNA S51 [$^\circ\text{C}$]	sense-RNA S52 [$^\circ\text{C}$]
S50	5'-d(TGG TGC ACG GTC TAC GA)	66,4	63,0
S57	5'-d(T _p _s G _p _s G _p _s TGC ACG GTC TAp _s Cp _s Gp _s A)	62,5	58,9
S53	5'-d(B ^T •B ^G •B ^G •TGC ACG GTC TB ^A •B ^C •B ^G •A)	65,1	61,1
S54	5'-d(D ^T •D ^G •D ^G •TGC ACG GTC TD ^A •D ^C •D ^G •A)	62,7	58,7
S55	5'-d(F ^T •F ^G •F ^G •TGC ACG GTC TF ^A •F ^C •F ^G •A)	59,4	48,8
S56	5'-d(M ^T •M ^G •M ^G •TGC ACG GTC TM ^A •M ^C •M ^G •A)	56,8	55,9

Erstaunlicherweise zeigt der 2,4-difluorbenzylmodifizierte Duplex **S51-S56** eine T_m -Wert-Erniedrigung von 9,6°C im Vergleich zum unmodifizierten Doppelstrang **S50-S51**.

Betrachtet man die Hybridisierung der Antisense-Oligonucleotide mit der RNA-Zielsequenz **S52** so zeigen alle erhaltenen Duplexe niedrigere T_m -Werte als die DNA/DNA-Analoga. Die Verhältnisse, wie sie bei den DNA/DNA-Hybriden erläutert wurden, sind jedoch nahezu identisch. Anzumerken bleibt, dass die Destabilisierung der modifizierten DNA/RNA-Doppelstränge höher ausfällt als bei den DNA/DNA-Duplexen. Besonders auffallend ist dies bei dem 4-phenylbutylmodifizierten Duplex **S52-S55**. Dieser weist eine T_m -Wert-Erniedrigung von 14,2°C im Vergleich zum unmodifizierten Pendant auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die ermittelten Schmelzpunkte der Antisense-Oligonucleotide mit den komplementären DNA- bzw. RNA-Sequenzen eine völlig ausreichende Stabilität für die Antisense-Anwendung gegen den Hepatitis C Virus am Tiermodell oder am Menschen aufweisen.

10.3 CD-spektroskopische Untersuchungen

Die CD-spektroskopischen Messungen wurden durchgeführt, um strukturelle Veränderungen der Helices, die aufgrund der Sechsfachmodifikation der Antisense-Oligonucleotide hervorgerufen wurden, zu untersuchen. Es wurden sowohl die DNA/DNA-Duplexe als auch die DNA/RNA-Heteroduplexe vermessen. Dazu wurden dieselben Lösungen verwendet, die zur Bestimmung der T_m -Werte zum Einsatz kamen (Kap. 10.2). Die Vorgehensweise erfolgte analog zu den CD-Untersuchungen der einfach modifizierten Oligonucleotid-Duplexe (siehe Kap. 8.3).

Abbildung 10.4 zeigt die CD-Spektren der DNA/DNA-Duplexe. Der Kurvenverlauf des unmodifizierten Duplexes **S50-S51** sowie der benzyl- und 2-phenylethylmodifizierten Duplexe **S51-S53** und **S51-S54** weist die typische Form einer B-DNA-Helix auf. Der Hauptunterschied liegt in der Intensität der positiven Elliptizität bei 280 nm. Die benzyl- und 2-phenylethylmodifizierten Duplexe **S51-S53** und **S51-S54** zeigen dabei eine signifikant geringere Intensität was – wie bereits eingehend erläutert (Kap. 8.3) - auf die verminderten Basenstapelungswechselwirkungen zurückzuführen ist. Dies dürfte die

Ursache für die niedrigeren T_m -Werte der modifizierten Duplexe im Vergleich zum unmodifizierten Doppelstrang **S50-S51** sein (vgl. Kap. 10.2). Im Falle des 4-phenylbutylmodifizierten Duplex **S51-S55** bildet sich keine typische B-Helix mehr aus. Dies spiegelt sich in dem drastisch veränderten Kurvenverlauf wider. Die gleichen Verhältnisse liegen auch bei dem 2,4-difluorobenzylmodifizierten Duplex **S51-S56** vor. Durch die drastische Veränderung der Helixform ist auch der niedrige Schmelzpunkt dieses Duplexes zu erklären. Der Kurvenverlauf des Phosphorthioat-Duplex **S51-S57** gleicht dem einer B-DNA, jedoch mit gering ausgeprägter Elliptizität bei 290 nm. Diese Beobachtung steht jedoch im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen CD-Spektren von Phosphorthioaten (Clark, 1997).

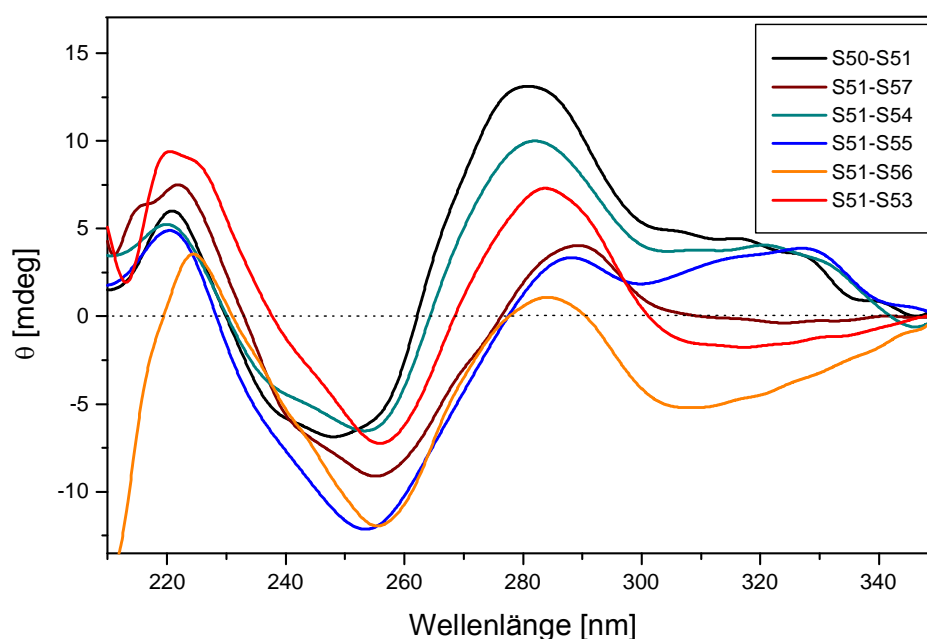


Abb. 10.4 CD-Spektren der Antisense-Oligonucleotide **S53-S57** nach Hybridisierung mit dem DNA-Gegenstrang **S51**

Die CD-Spektren der DNA/RNA-Heteroduplexe weisen alle die A-Form einer Doppelhelix auf. Im Falle des unmodifizierten Duplex **S50-S52** ist dies sehr gut durch ein ausgeprägtes Maximum bei 262 nm im positiven Bereich und ein schwaches Minimum bei 235 nm im negativen Bereich ersichtlich. Betrachtet man die phenylalkylmodifizierten Heteroduplexe **S52-S53**, **S52-S54**, **S52-S55** und **S52-S56**, so erkennt man jeweils eine deutliche bathochrome Verschiebung des positiven Maximums um 4 nm bis 11 nm im Vergleich zum unmodifizierten Doppelstrang. Auch verringert sich die Intensität der

positiven Elliptizität in diesem Bereich. Die Abnahme steht wiederum in Korrelation mit den ermittelten T_m -Werten dieser Duplexe (Kap. 10.2). Die Kurvenform des Phosphorthioat-Duplexes **S52-S57** stimmt mit den literaturbekannten Angaben überein (Clark, 1997).

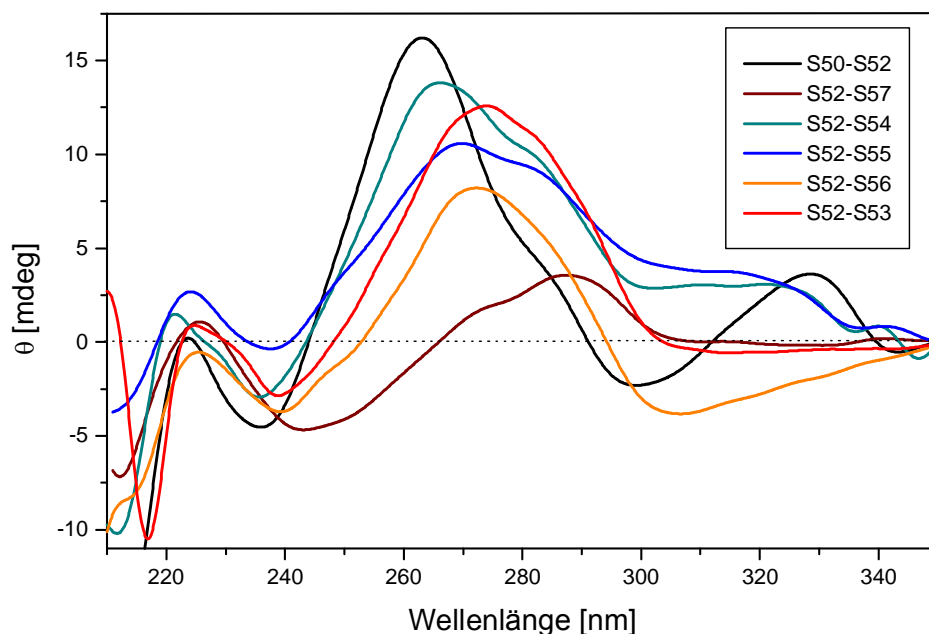


Abb. 10.5 CD-Spektren der Antisense-Oligonucleotide **S53-S57** nach Hybridisierung mit dem RNA-Gegenstrang **S52**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich im Falle der benzyl- als auch 2-phenylethylmodifizierten Duplexe die entsprechende B- (DNA/DNA) bzw. A-Helixform (DNA/RNA) ausbildet. Bei den 4-phenylbutyl- und 2,4-difluorbenzylmodifizierten Duplexen kommt es bei den DNA/DNA-Hybriden zu einer signifikanten Abweichung von der üblichen B-Helixform, während die entsprechenden DNA/RNA-Heteroduplexe die erwartete A-Form einnehmen. Aus strukturellen Aspekten sollten somit alle synthetisierten phenylalkylmodifizierten Oligonucleotide für den Antisense-Einsatz geeignet sein.

10.4 Lipophilie der Antisense-Oligonucleotide

Ein Ziel der neu synthetisierten DNA-Rückgratmodifikationen war die Lipophilie der zum Einsatz kommenden Antisense-Oligonucleotide zu erhöhen. Wie bereits bei den einfach arylalkylmodifizierten Oligonucleotiden gezeigt werden konnte lässt sich die Lipophilie sehr gut anhand der relativen Retentionszeiten - die durch RP-HPLC ermittelt werden - bestimmen (Kap. 8.4). Es wurden 0,2 bis 0,3 OD des jeweiligen Antisense-Oligonucleotids auf eine analytische Säule der Firma Merck (Purospher® STAR RP-18e Material („endcapped“) 5 µm) injiziert. Die Chromatographie erfolgte mittels eines Gradienten aus 0% bis 60% Acetonitril in 0,1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 7,0) innerhalb von 30 Minuten. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min und die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Wie bei den mono-modifizierten Hexameren weisen die sechsfach modifizierten benzyl-, 2-phenylethyl- und 4-phenylbutylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide **S53**, **S54** und **S55** signifikant längere Retentionszeiten auf als der unmodifizierte Strang **S50** und das Phosphorthioat **S57** (Abb. 10.6). Auch lässt sich sehr gut erkennen, dass die Retentionszeit mit der Verlängerung der Alkylkettenlänge von eins zu zwei und weiter zu vier (CH₂)-Gruppen kontinuierlich ansteigt. Überraschenderweise wurde für das 2,4-difluorbenzylmodifizierte Oligonucleotid **S56** mit 11,53 Minuten eine deutlich kürzere Elutionszeit ermittelt als für das benzylmodifizierte Pendant **S53** mit 15,15 min. Im Falle der einfach modifizierten Hexamere zeigten die fluorsubstituierten Benzylderivate **S12** und **S13** eine längere Retentionszeit als der unsubstituierte benzylmodifizierte Strang **S03**. Grund hierfür dürfte die stärkere Hydratation des sechsfach modifizierten 17mers im Vergleich zum einfach modifizierten Hexamer sein.

Bei den phenylalkylmodifizierten Oligonucleotiden **S53-S56** kann ferner eine deutliche Signalverbreiterung im Vergleich zum unmodifizierten 17mer **S50** festgestellt werden. Diese fällt umso stärker aus, je sterisch anspruchsvoller und lipophiler die Modifikationen im entsprechenden 17mer sind. Die Verbreiterung lässt sich mit dem Vorliegen von Diastereoisomerengemischen erklären. Aufgrund von sechs Rückgratmodifikationen entstehen bei der Oligonucleotid-Festphasensynthese $2^6=64$ diastereoisomere 17mere. Da die Sp- und Rp-konfigurierten Phosphatrückgratmodifikationen unterschiedlich rasch von der Säule eluieren kommt es zu der beobachteten Peakverbreiterung.

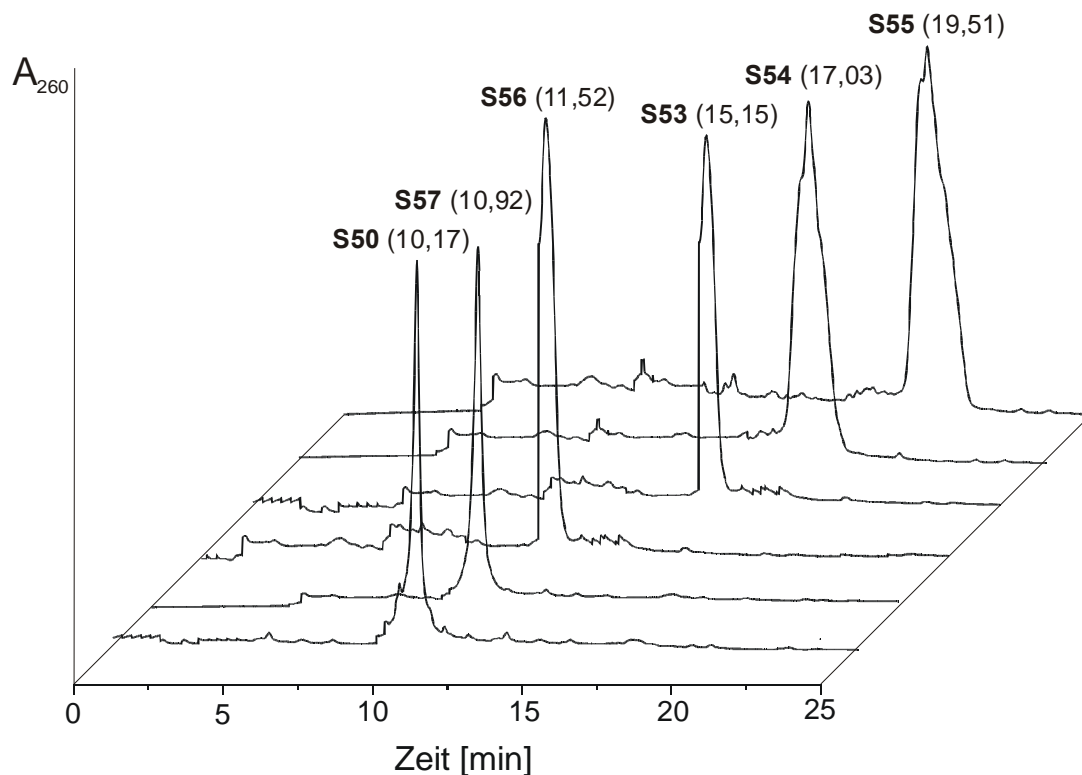


Abb. 10.6 RP-HPLC-Profile der Antisense-Oligonucleotide mit den entsprechenden Retentionszeiten zur Bestimmung der Lipophilie

10.5 Stabilität gegenüber Nuclease P1

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 erläutert spielt die Stabilität gegenüber Nucleasen eine entscheidende Rolle für die Einsetzbarkeit von Antisense-Oligonucleotiden. Die für die Tests in den letzten Jahren standardmäßig eingesetzte 3'-Exonuclease Schlangengift Phosphodiesterase (*Crotalus durissus*) ist nicht mehr käuflich zu erwerben. Aufgrund dessen wurden die synthetisierten Oligonucleotide hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber der Endonuclease P1 untersucht. Diese einzelstrangspezifische Nuclease ist in der Lage sowohl DNA- als auch RNA-Oligonucleotide zu schneiden. Die Bestimmung der Stabilität erfolgte mittels UV-Spektroskopie an einem Cary-1 Gerät der Firma Varian. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die Absorption der monomeren Nucleotide höher ist als die Absorption der entsprechenden Nucleotide die sich in Oligomeren befinden. Für die

Messung wurden jeweils 3 μM (0,5 OD) Oligonucleotid **S50**, **S53-S57** in 1,0 ml 0,2 M Natriumacetatpuffer (pH 5,3) einpipettiert und mit 300 mU Nuclease P1 versetzt. Die Küvette wurde umgehend in den Strahlengang gebracht und die Absorptionszunahme bei 20°C in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen. In Abbildung 10.7 sind die erhaltenen Kurven abgebildet. Wie erwartet erfolgte der Abbau des unmodifizierten Stranges **S50** sehr rasch. Bereits nach 30 s war der Strang fast völlig verdaut. Bei Betrachtung der phenylalkylmodifizierten Oligonucleotide ist ein signifikant langsamerer Abbau festzustellen. Das 2-Phenylethylphosphonat **S54** ist dreimal, das Benzyl- **S53** und 2,4-Difluorbenzylphosphonat **S56** viermal und das 4-Phenylbutylphosphonat **S56** fünfmal resistenter gegenüber der Nuclease P1 als der unmodifizierte Strang **S50**.

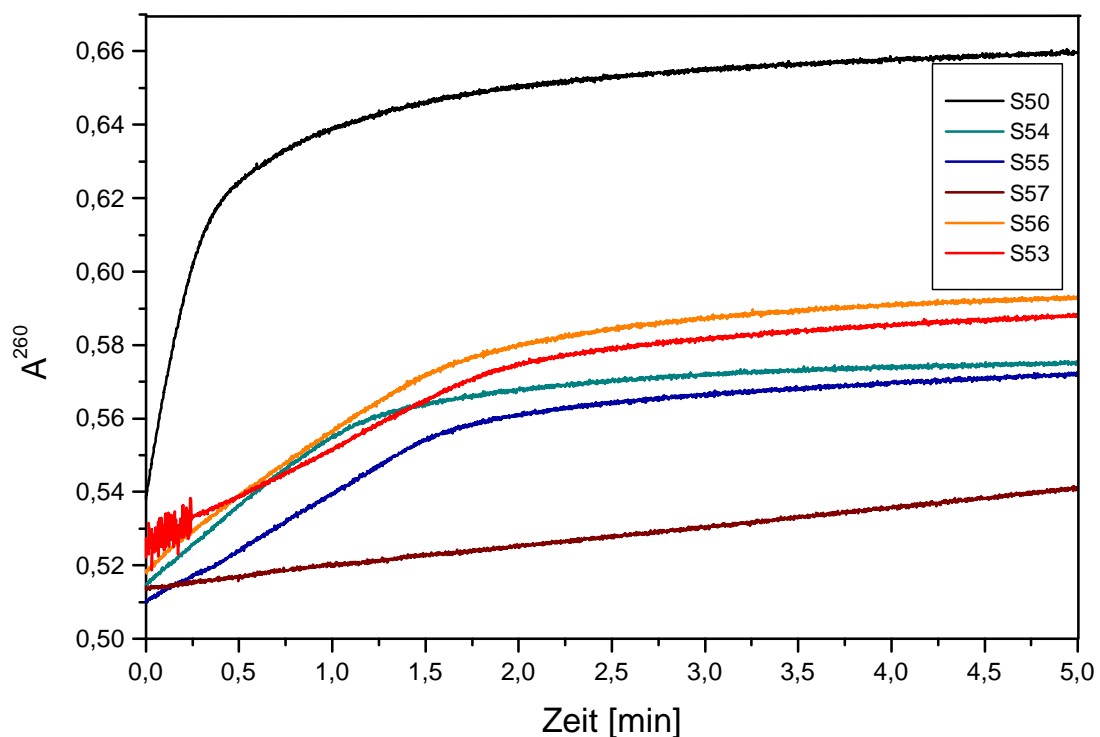


Abb. 10.7 Stabilität der Antisense-Oligonucleotide gegenüber Nuclease P1

Bei dem Phosphorthioat **S57** wurde eine sehr langsame, lineare Zunahme der Absorption beobachtet. Ein konstanter Absorptionswert konnte erst nach 11 Minuten festgestellt werden. Dies ergab eine 22fache Stabilisierung des Stranges gegenüber dem unmodifizierten Analogon **S50**. Diese Feststellung deckt sich mit literaturbekannten Erkenntnissen. Im Falle der Phosphorthioate werden Sp-konfigurierte Phosphorthioate

spezifisch von Nuclease P1 gespalten, während Rp-konfigurierte Pendants nur sehr langsam hydrolysiert werden (Koziolkiewicz, 1995).

10.6 Aktivierung der RNase H

Die Aktivierung der RNase H und die damit verbundene Spaltung der RNA-Zielsequenz ist der effektivste Mechanismus zur Inhibierung der Genexpression mittels Antisense-Oligonucleotiden (Kap. 3.2.1). Durch die Modifikation des Phosphatrückgrats kann die Aktivierung der RNase H ausbleiben, wodurch dieser Wirkmechanismus nicht mehr zur Verfügung steht. Dieser Effekt wird unter anderem bei den Methylphosphonaten, PNA's und Morpholino-Oligonucleotiden beobachtet, während die Phosphorthioate und die LNA's die RNase H aktivieren (Kap. 2.3.3).

Um zu überprüfen inwieweit die phenylalkylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide in der Lage sind die RNase H zu aktivieren wurde, das 30mer RNA-Oligonucleotid 5'-r(GAGGUC**UCGUAGACCGUGCACCA**UGAGCAC) **S58** synthetisiert. Dieses entspricht den Nucleotiden 320-349 der 5'-NCR des Hepatitis C Virus und enthält die RNA-Zielsequenz für die Antisense-Oligonucleotide. Die hervorgehobenen Nucleotide geben die Angriffsstelle der 17mer Antisense-Oligonucleotide **S53-S57** an. Für die spätere Detektion wurde die 5'-Position der RNA durch [γ - ^{32}P]-ATP unter Verwendung der T4-Polynucleotid-Kinase ^{32}P -markiert. Für die Messung wurden 50 pM der RNA mit jeweils 25 pM Antisense-Oligonucleotid für 2 Minuten bei 37°C in 10 μl Reaktionslösung inkubiert. Die Lösung bestand aus 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 4 mM MgCl_2 , 1 mM DTT und 1 μl Polymerase III Zellextrakt. Das Polymerase III Zellextrakt wurde anstelle von rekombinanter RNase H eingesetzt, wodurch die Zellbedingungen besser nachgeahmt werden können. Da sich auch andere RNasen in diesem Zellextrakt befinden, wurde der RNase Inhibitor RNasin zugegeben (Scherr, 1998). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Ladepuffers gestoppt und die Lösungen auf ein Polyacrylamid-Gel, das 8 M Harnstoff enthielt, gegeben. Die radioaktiven Banden wurden mittels eines Autoradiographen visualisiert. Das erhaltene Gel ist in Abbildung 10.8 abgebildet.

Die ersten drei Banden zeigen dabei die Kontrollexperimente mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen von 50 pM, 25 pM und 10 pM, bei denen kein Antisense-Oligonucleotid

zugesetzt wurde. Es ist gut zu erkennen, dass die RNA nicht abgebaut wurde. Die folgenden Banden zeigen die Lösungen, bei denen die unterschiedlichen Antisense-Oligonucleotide zugegeben wurden. Im Falle des 2-Phenylethylphosphonats **S54**, 2,4-Difluorbenzylphosphonats **S56** und Phosphorthioats **S57** ist die RNA, wie beim unmodifizierten Strang **S50**, vollständig geschnitten. Als Hauptspaltprodukt ist dabei ein 12 Nucleotide langes Oligonucleotid entstanden. Durch die Zugabe des 4-phenylbutylmodifizierten Antisense-Oligonucleotids **S55** wurde die RNA nicht vollständig gespalten.

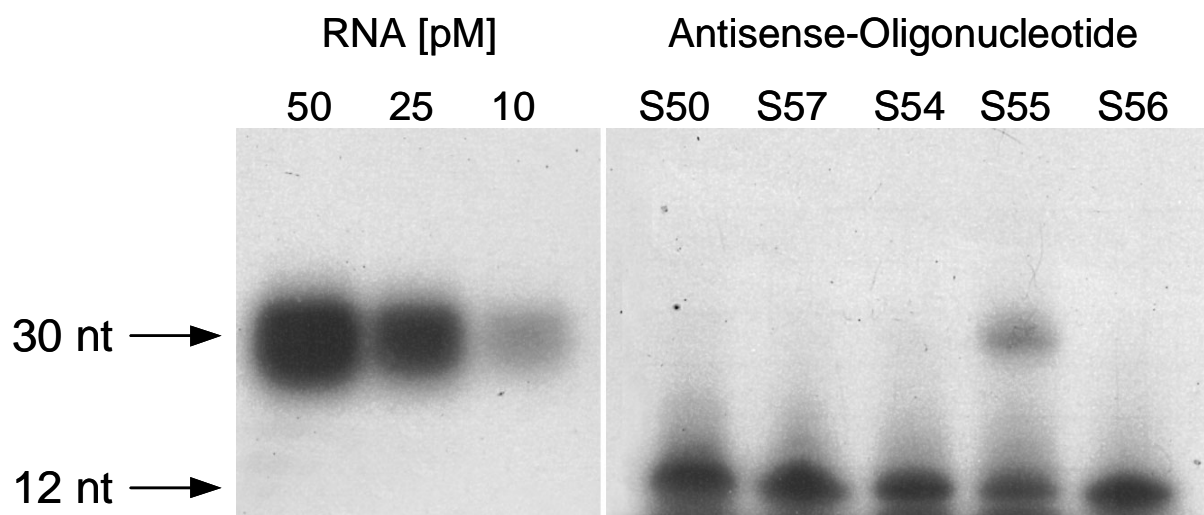


Abb. 10.8 RNA-Spaltung durch Aktivierung der RNase H

Die Resultate demonstrieren, dass 2-phenylethyl- und 2,4-difluorbenzylmodifizierte Antisense-Oligonucleotide in der Lage sind die RNase H zu aktivieren. Dabei ist im Vergleich zu den Phosphorthioaten kein Unterschied in der Effektivität zu erkennen.

10.7 *In vitro*-Untersuchungen

10.7.1 Zellfreie *in vitro*-Untersuchungen

Die Wirksamkeit der phenylalkylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. W.H. Caselmann bestimmt. Der *in vitro*-Translations-Assay wurde dabei von Michael Alt entwickelt (Alt, 1995). Ein Hauptbestandteil des zellfreien Assays ist ein Plasmid-Konstrukt mit dem Namen pT7NCRLuc, das beginnend von 5'-Ende aus dem T7-Promotor für die RNA-Polymerase, den 341 Nucleotiden der nicht codierenden Region (5'-NCR) und den 66 Nucleotiden des Core-Gens zusammensetzt ist (Abb. 10.9). Die ersten drei Nucleotide des Core-Gens sind zugleich das Startcodon für die Proteinbiosynthese. Nach dem Core-Gen wurde die für die Firefly-Luciferase codierende Sequenz ohne ihr eigenes Startcodon im Leseraster kloniert.

Für die Durchführung des Translations-Assays wurde zunächst das Plasmid pT7NCRLuc *in vitro* transkribiert. Der resultierende RNA-Strang enthält die Zielsequenz für die zu testenden Antisense-Oligonucleotide und hat eine Größe von 2371bp (Sakamoto, 1996). Die dreidimensionale Struktur des transkribierten Stranges ermöglicht die Erkennung durch die Ribosomen und führt zur Synthese des Proteins, dass über die coexprimierte Firefly-Luciferase nachgewiesen werden kann.

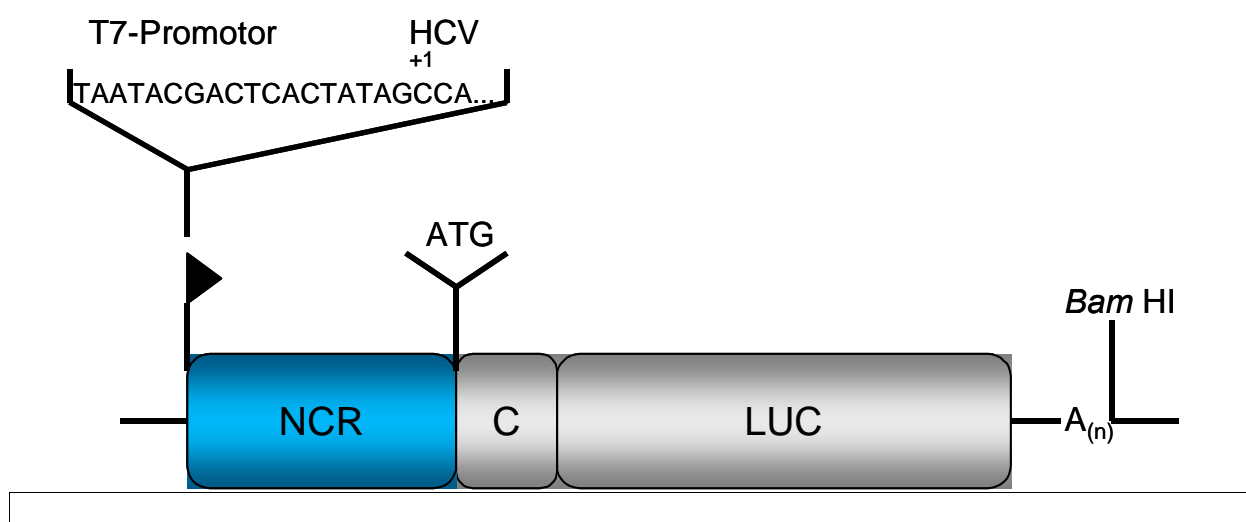


Abb. 10.9 Schematische Darstellung des HCV-Luciferase Reporter-Gen-Konstrukts pT7NCRLuc für den zellfreien *in vitro*-Translations-Assay.

Für die Durchführung der Messungen wurden die Antisense-Oligonucleotide zuerst in einem Puffer aus 100 mM NaCl und 10 mM TRIS-HCl (pH 7,5) mit der transkribierten RNA vorhybridisiert. Es wurde mit Oligonucleotid-Konzentrationen von 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1,0 μ M, 2,0 μ M und 5,0 μ M gearbeitet. Die Menge an RNA betrug jeweils 50 ng. Für die Hybridisierung wurde die Lösung 10 Minuten auf 75°C erhitzt und anschließend innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur abgekühlt. Die so erhaltenen Lösungen wurden zu 12 μ l Kaninchen-Reticulozyten-Lysat (Promega, Heidelberg) gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurde ein Drittel der Translationslösung entnommen und zu 100 μ l des Luciferase-Assay-Reagenzes gegeben. Nach 30 s wurde die relative Lichtausbeute an einem Berthold AutoLumat LB953 Luminometer bestimmt. Als 100% Lichtausbeute wurde der Wert festgelegt, der bei dem parallel laufenden Kontrollexperiment ohne Antisense-Oligonucleotid ermittelt wurde (Alt, 1999).

Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro*-Translations-Assays sind in Abbildung 10.10 graphisch dargestellt. Die Inhibierungsversuche für das 2,4-difluorbenzylmodifizierte Oligonucleotid **S56** stehen noch aus.

Für alle getesteten Antisense-Oligonucleotide **S53-S55** sowie **S57** konnte eine dosisabhängige, im Vergleich zur „Mismatch“-Kontrolle **tS-13K** hochspezifische Inhibierung der Genexpression gefunden werden. Als Kontroll-Oligonucleotid diente das sechsfach modifizierte Phosphorthioat **tS-13K** 5'-d(T•G•C•TGCACGCTCTA•G•G•A), welches drei Fehlpaarungen zur RNA-Zielsequenz ausbildet. Dabei wurden zwei Guanosen durch Cytosin sowie ein Cytosin durch Guanosin ersetzt (unterstrichene Nucleotide zeigen die Fehlpaarungsstellen an).

Die beste Inhibierung von 96% \pm 2% konnte mit dem Phosphorthioat **S57** erzielt werden. Der IC₅₀-Wert liegt dabei bei 125 nM. Auch zeigten die 2-phenylethyl- und benzylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide **S53** und **S54** mit 92% \pm 3% beziehungsweise 87% \pm 4% eine sehr gute Inhibierung der Genexpression. Im Vergleich zum Phosphorthioat **S57** lagen die IC₅₀-Werte mit 400 nM für das Benzylphosphonat **S53** und 700 nM für das 2-Phenylethylphosphonat **S54** etwas höher. Die geringste Inhibierung von 80% \pm 5% wurde mit dem 4-phenylbutylmodifizierten Oligonucleotid **S55** erzielt. Auch ist der ermittelte IC₅₀-Wert von 1,0 μ M höher als bei allen anderen 17meren. Die geringere Inhibitionsrate ist vermutlich auf die schwächer ausgeprägte Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz (vgl. Kap. 10.2) und die durch die Modifikationen hervorgerufenen strukturellen Veränderungen (vgl. Kap. 10.3) zurückzuführen. Ein weiterer Grund für die

niedrigere Inhibierungsrate könnte die geringere Aktivierung der RNase H sein (Kap. 10.6), auch wenn die Aktivierung der RNase in Kaninchen-Reticulozyten-Lysaten im Allgemeinen sehr gering ist (Alt, 1997; Crooke, 1996).

Die Resultate der zellfreien *in vitro*-Inhibierung verdeutlichen, dass die phenylalkyl-modifizierten Oligonucleotide sehr gut für den Antisense-Einsatz gegen die HCV-Genexpression geeignet sind.

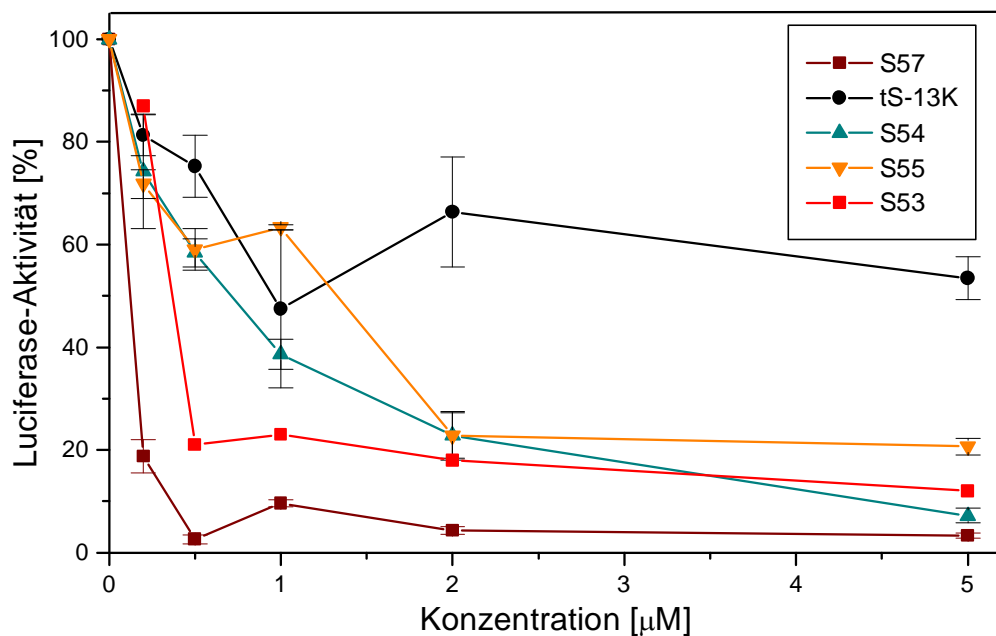


Abb. 10.10 Graphische Darstellung der zellfreien *in vitro*-Inhibierung der HCV-Genexpression durch phenylalkylmodifizierte Antisense-Oligonucleotide. **tS-13K**=Phosphorthioat „Mismatch“-Kontrolle (5'-d(T•G•C•TGCACGCTCTA•G•G•A)), die unterstrichenen Nucleotide sind für die Fehlpaarungen verantwortlich.

10.7.2 *In vitro* Zellkultur-Untersuchungen

Die Zellkultur-Untersuchungen wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W.H. Caselmann an der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt. Das für den *in vitro* Zellkultur-Translations-Assay eingesetzte Plasmid-Konstrukt ähnelt vom Aufbau her dem Plasmid, das im zellfreien *in vitro*-Translations-Assay zum Einsatz kam. Das Konstrukt pCMVNCRLuc ist in Abb. 10.11 abgebildet. Im Vergleich zu dem in Kap. 10.6 dargestellten Plasmid-Konstrukt ist vor dem T7-Promoter zusätzlich der CMV-Promotor für höhere Zellen einkloniert. Zudem befindet sich am 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal. Für die Bestimmung der Antisense-Effizienz der phenylalkylmodifizierten Oligonucleotide in Zellkultur wurden Leberzelllinien wie HepG2-Zellen oder CCI13-Zellen stabil mit dem Plasmid pCMVNCRLuc transfiziert. In früheren Arbeiten wurden die HepG2-Zellen noch transient mit dem entsprechenden Plasmid-Konstrukt transfiziert (Alt, 1995).

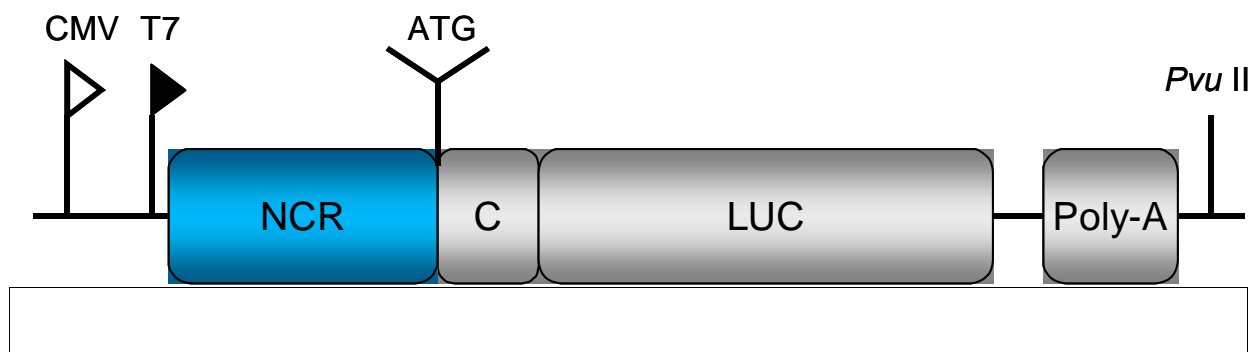


Abb. 10.11 Schematische Darstellung des HCV-Luciferase Reporter-Gen Konstrukts pCMVNCRLuc für den *in vitro* Zellkultur-Translations-Assay

Für die Zellkultur-Translations-Assays wurden 1×10^5 HepG2-Zellen (ATCC HB 8065) bzw. 1×10^4 CCI13-Zellen pro Titerplatte in Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium, das 10% fötales Kälberserum, 30 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin enthält, ausgesät. Nach 18 Stunden wurden die stabil transfizierten Zellen mit 2,0 µM des entsprechenden Antisense-Oligonucleotids nach der Lipofektin-Methode (Life Technologies, Eggenstein) überschichtet. Die Luciferase-Aktivität wurde bei den HepG2-

Zellen nach 4 Stunden und bei den CCI13-Zellen nach 24 Stunden sowie nach 48 Stunden bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen. Für den eigentlichen Luciferase-Assay wurde ein Aliquot der Zellen mit 25 mM Tris-H₃PO₄, 2 mM CDTA, 2 mM DTT, 10% Glycerol und 1% Triton X-100 bei pH=7,8 lysiert. Um den Zellschrott abzutrennen, wurde das Lysat zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes mit einem Protein-Assay bestimmt. Die Lösung wurde mit 100 µl Luciferase-Reagenz versetzt und die relative Lichtausbeute nach 30 s an einem Luminometer bestimmt.

Bei den Hemmversuchen in den Zellkulturen wurde jeweils auch das sechsfach terminal modifizierte 23mer-Phosphorthioat **tS-10** [5'-d(T•G•C•TCATGGTGCACGGTCTA•C•G•A)] und die „Mismatch“-Kontrollen **tS-10K** [5'-d(T•G•C•TGATGCTGCACGCTCTA•G•G•A)] sowie **tS-13K** [5'-d(T•G•C•TGCACGCTCTA•G•G•A)] mit untersucht. Zum einen konnten so – durch Vergleich der Inhibierungsraten mit früheren Untersuchungen - Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der Messungen gezogen werden und zum anderen konnten die Ergebnisse, die durch die phenylalkylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide erzielt wurden, besser bewertet werden. Abbildung 10.12 zeigt die erhaltenen Inhibierungsraten in HepG2-Zellen nach einer Zeit von 4 Stunden.

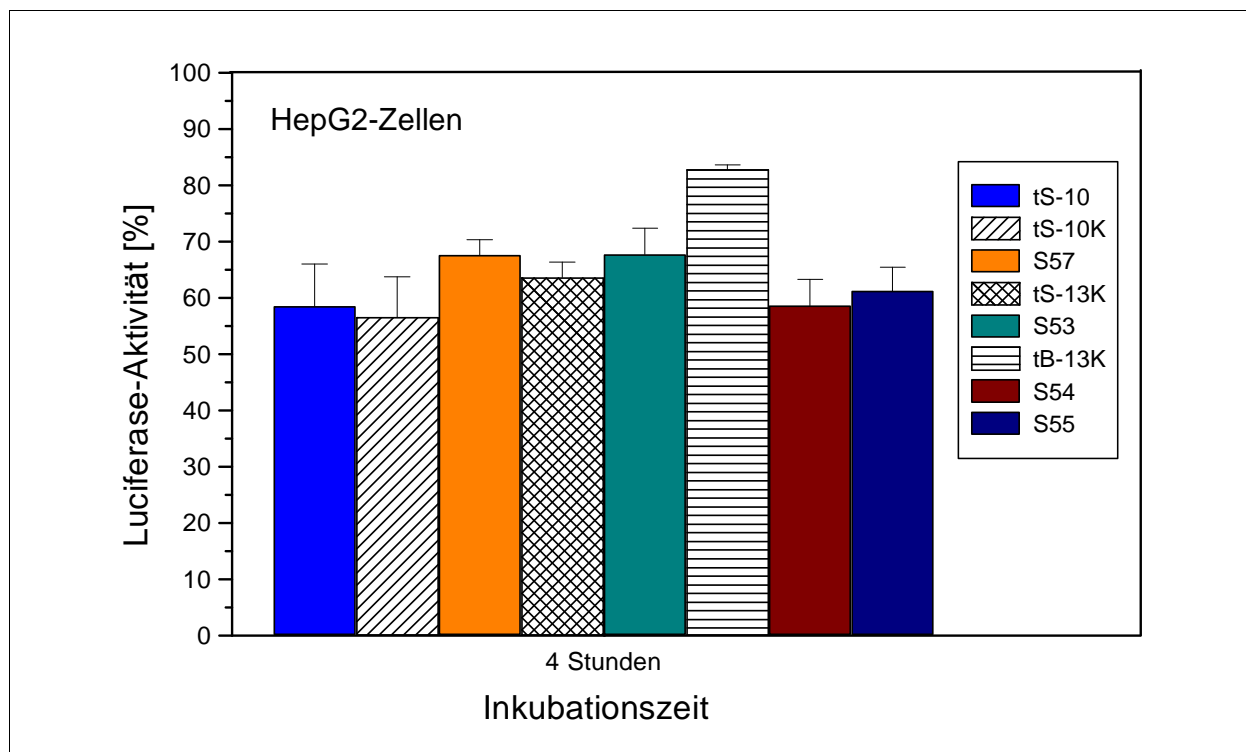


Abb. 10.12 Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferase-Fusionsgens in HepG2-Zellen

Die größte Inhibierung von jeweils 42% konnte mit dem 23mer Phosphorthioat **tS-10** und dem 2-Phenylethylphosphonat **S54** erzielt werden. Auch das 4-phenylbutylmodifizierte Antisense-Oligonucleotid **S55** zeigte, im Gegensatz zu den zellfreien *in vitro*-Untersuchungen (Kap. 10.6), mit 39% eine gute Effizienz. Die Inhibierung mittels des 17mer Phosphorthioats **S57** und des Benzylphosphonates **S53** fiel mit jeweils 33% etwas geringer aus. Betrachtet man die Phosphorthioat „Mismatch“-Kontrollen **tS-10K** und **tS-13K**, so zeigen diese ähnliche Inhibierungsraten wie die regulären Oligonucleotide **tS-10** und **S57**. Dieses Problem trat in HepG2-Zelllinien bereits früher in unregelmäßigen Abständen auf. Nur die benzylmodifizierte Kontrolle **tB-13K** [5'-d(T•G•C•TGCACGCTCTA•G•G•A)] zeigt den erwarteten Wert.

Aus diesem Grund wurden alle weiteren Hemmversuche in CCI13-Zellen durchgeführt. Dort zeigten alle „Mismatch“-Kontrollen jeweils nur eine geringfügige Inhibierung des HCV-Luciferase-Fusionsgens (Abb. 10.13). Die Inhibierung wurde jeweils nach 24 Stunden und 48 Stunden bestimmt. Nach 24 Stunden zeigen die 2-phenylethyl-, 2,4-difluorbenzyl- und benzylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide **S54**, **S56** und **S53** wie auch das Phosphorthioat **S57** eine signifikante Inhibierung des HCV-Luciferase-Fusionsgens. Die Effizienz dieser 17mere ist im Rahmen der Fehlergrenzen nahezu identisch. Erstaunlicherweise zeigt das 23mer Phosphorthioat **tS-10** eine deutlich geringere Inhibierungsrate. Mit dem 4-phenylbutylmodifizierten Oligonucleotid **S55** konnte keine spezifische Inhibierung festgestellt werden. Die Gründe hierfür dürften in der deutlich schwächeren Hybridisierung des Oligonucleotids mit der RNA-Zielsequenz (Kap. 10.2) und der signifikant schwächeren Aktivierung der RNase H (Kap. 10.6) zu suchen sein.

Nach 48 Stunden nimmt die Inhibierungsrate aller Antisense-Oligonucleotide deutlich ab. Dies deutet auf eine enzymatische Zersetzung der Oligomere hin. Es lässt sich jedoch erkennen, dass die Inhibierung der Phosphorthioate **tS-10** und **S57** signifikant stärker abnimmt als die der 2-phenylethyl-, 2,4-difluorbenzyl- und benzylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide **S54**, **S56** und **S53**.

In einem weiteren Zellkulturexperiment mit CCI13-Zellen wurde auf die Zugabe des „uptake enhancers“ Lipofektin verzichtet. Dabei konnte keine signifikante Inhibierung der HCV-Genexpression beobachtet werden (Abb. 10.14). Dies unterstreicht die Tatsache, dass ohne die Zugabe eines kationischen Liposoms die Antisense-Oligonucleotide nicht, oder nur sehr schlecht, die Zellmembran passieren können.

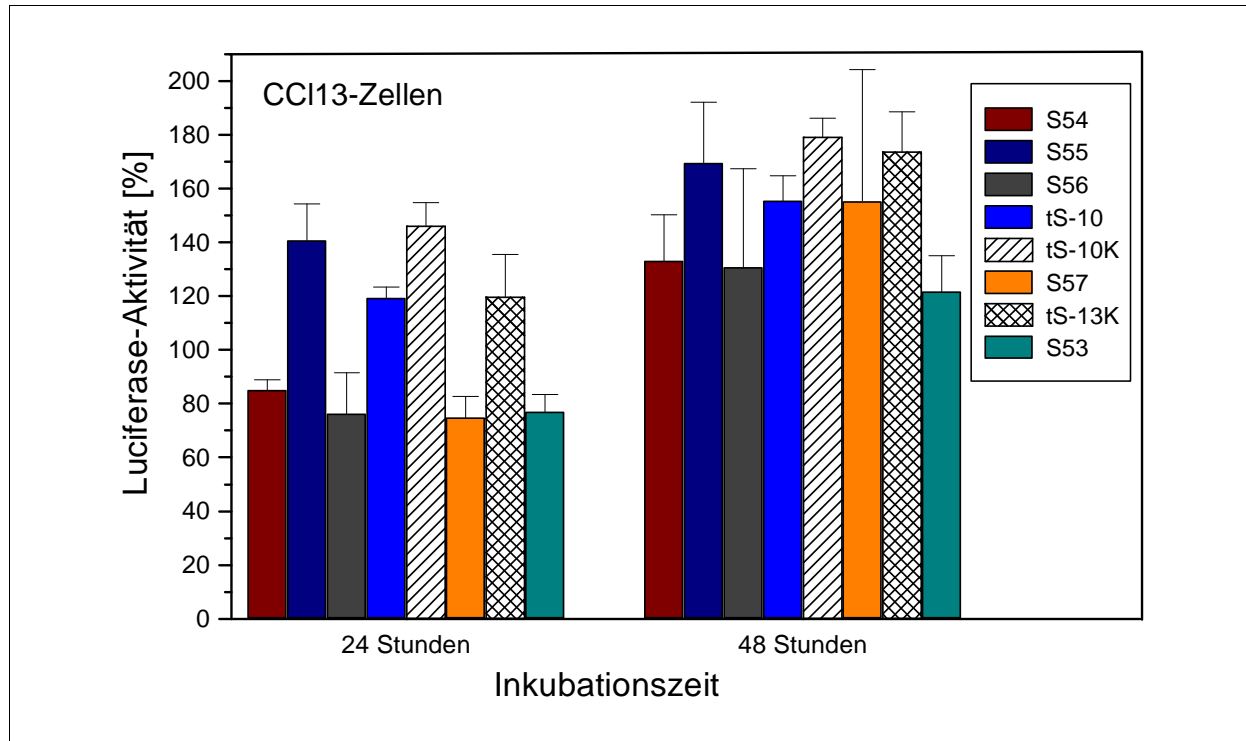


Abb. 10.13 Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferase Fusionsgens in CCI13-Zellen

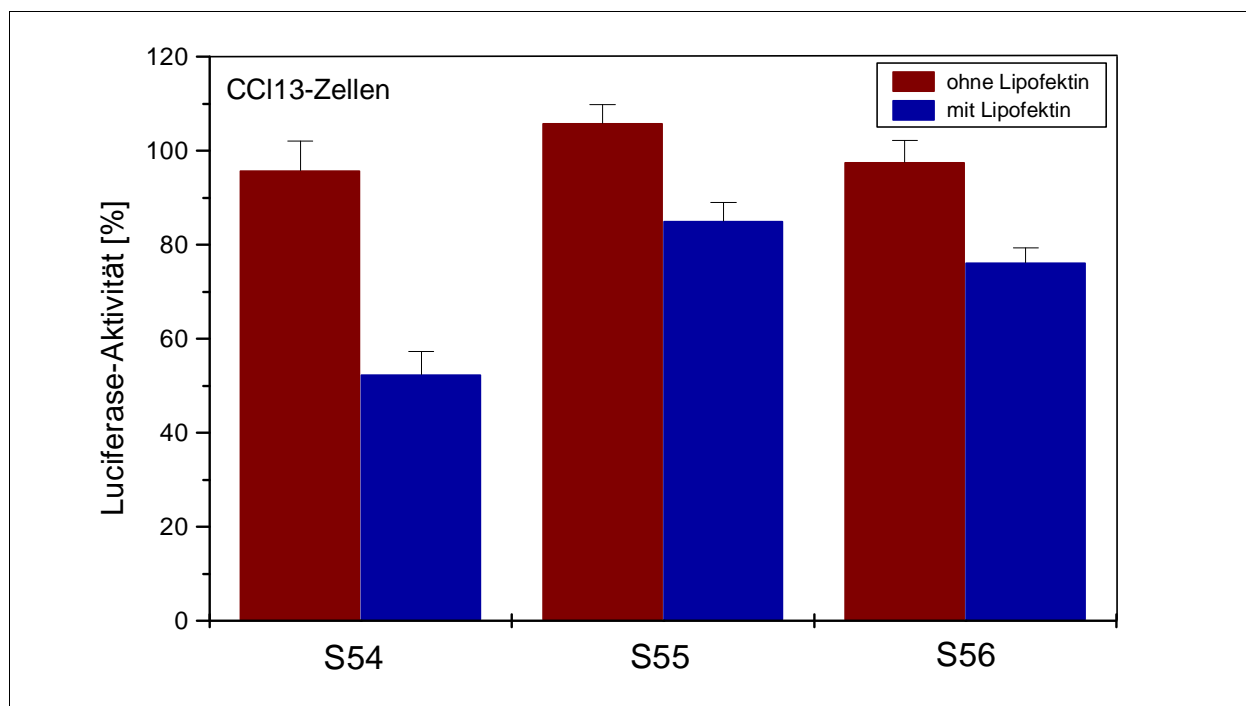


Abb. 10.14 Graphische Darstellung der Inhibierung des HCV-Luciferase Fusionsgens in CCI13-Zellen mit und ohne Zugabe von Lipofektin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die zellfreien *in vitro* wie auch die *in vitro*-Zellkultur-Untersuchungen zeigen, dass phenylalkylmodifizierte Antisense-Oligonucleotide effiziente und spezifische Inhibitoren der HCV-Genexpression sind. In ihrer Effektivität sind sie mit den Phosphorthioaten gleichzusetzen, in einigen Fällen sogar überlegen. Das Ziel folgender Arbeiten sollte sein, Modifikationen mit größerem Ringsystem einzuführen. Vielversprechende Kandidaten sind in diesem Zusammenhang (naphth-1-yl)methyl- (**I**) und 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierte (**K**) Antisense-Oligonucleotide. Die entsprechenden modifizierten Phosphoramidite wurden bereits im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und auf deren Einfluss in Duplexen untersucht. Letzterer hätte zudem den Vorteil, dass aufgrund der Eigenfluoreszenz des Anthracens die Zellaufnahme verfolgt werden könnte.

11 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Synthese, Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten von Arylalkyl-Rückgrat modifizierten DNA-Oligonucleotiden untersucht. Die Substitution eines der nichtbindenden Sauerstoffatome des Phosphatrückgrats durch eine ungeladene Gruppe bringt interessante Veränderungen der Eigenschaften der resultierenden Oligonucleotid-Duplexe mit sich. Diese hängen sehr stark von der absoluten Konfiguration der Modifikation ab. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war, lipophile, arylalkylmodifizierte Oligonucleotide zu synthetisieren und die Auswirkungen der absoluten Konfiguration der Modifikationen auf die Eigenschaften der resultierenden Duplexe zu untersuchen. Als zweites sollten die Modifikationen in Antisense-Oligonucleotide eingebaut werden um diese auf ihre Anwendbarkeit für die Inhibierung der HCV Genexpression zu testen.

In Abbildung 11.1 sind alle synthetisierten Modifikationen dargestellt. Um den Einfluss der Alkylkettenlänge auf die Eigenschaften der Oligonucleotide zu untersuchen wurden die Benzyl- (**B**), 2-Phenylethyl- (**D**), 3-Phenylpropyl- (**E**), 4-Phenylbutyl- (**F**) und 5-Phenylpentylphosphonate (**H**) dargestellt. Die Abhängigkeit der Eigenschaften von der Größe des aromatischen Systems wurden mittels der (Naphth-1-yl)methyl- (**I**), 3-(Naphth-1-yl)propyl- (**J**) und der 3-(Anthracen-9-yl)propylphosphonate (**K**) bestimmt.

Zudem wurden Rückgratmodifikationen synthetisiert, deren Ringsystem durch funktionelle Gruppen substituiert war. Dazu gehörten die 4-Fluorbenzyl- (**N**), 2,4-Difluorbenzyl- (**M**), p-Methylbenzyl- (**O**), p-Methoxybenzyl- (**P**), p-(*t*-Butyl)benzyl- (**Q**) und 4-(4-Fluorphenyl)butylphosphonate (**R**). Als Vergleichsmodifikationen wurden zudem die entsprechenden Methylphosphonate (**S**) und die Phosphorthioate (**p_S**) dargestellt.

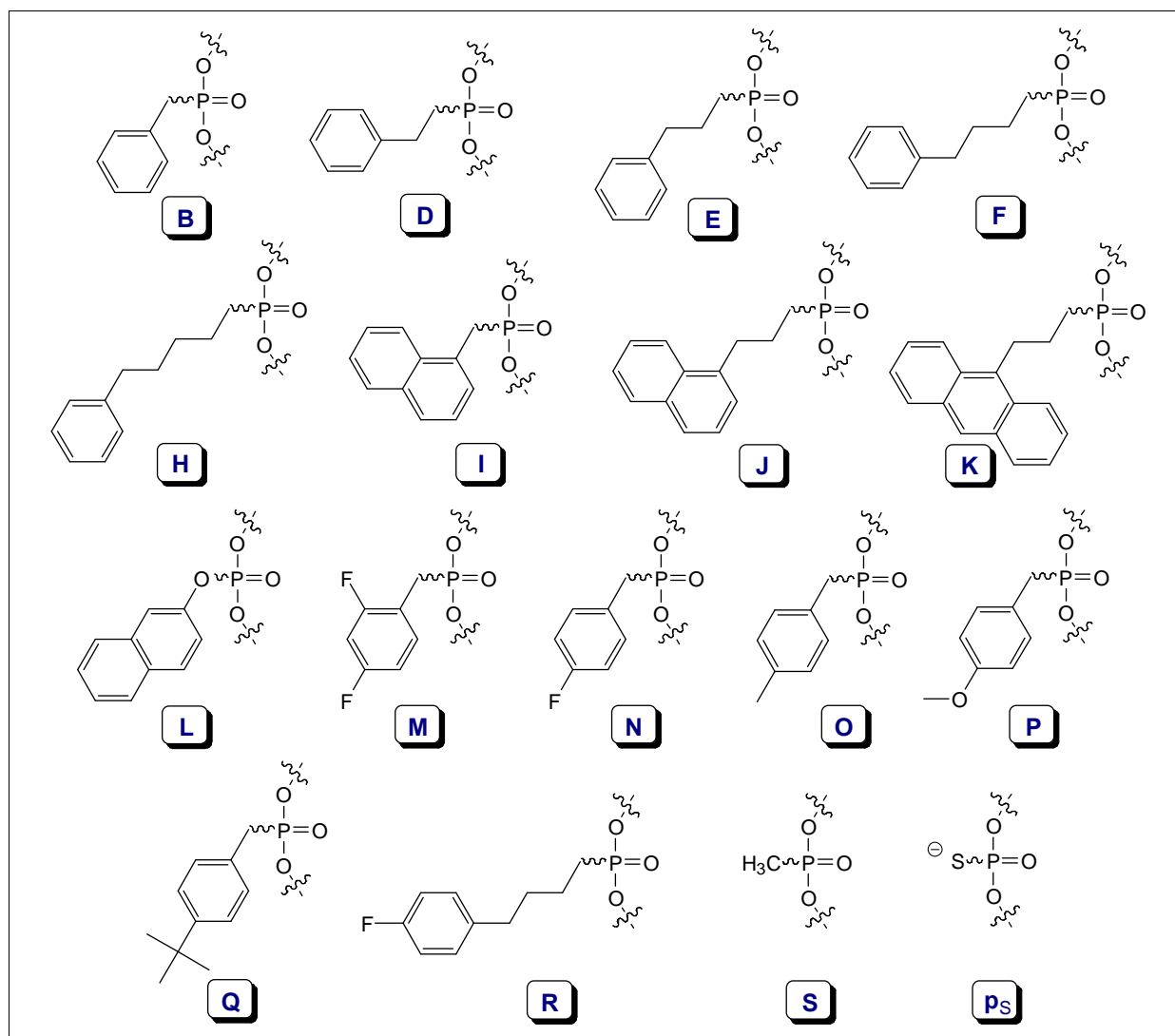


Abb. 11.1 Synthetisierte DNA-Rückgrat-Modifikationen

Die Rückgratmodifikationen wurden über die Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode in Oligonucleotide eingebaut. Als Ausgangsverbindungen für die modifizierten Phosphoramidite dienten die Arylalkylhalogide. Diese wurden in einer Grignard-Reaktion zu den entsprechenden magnesiumorganischen Verbindungen umgesetzt. In einer *in situ* Reaktion erfolgte die Ummetallierung in die unreaktiveren cadmiumorganischen Substanzen. Die weitere Umsetzung der metallorganischen

Spezies mit Phosphortrichlorid führte zu den Arylalkyldichlorphosphanen. Die Synthese der Dichlorphosphate erwies sich dabei als Schlüsselschritt für die Darstellung der Phosphoramidite. Die weitere Reaktion der Dichlorphosphate mit *N,N*-Diisopropylamin führte zu den (Arylalkyl)(diisopropylamin)chlorphosphanen, welche mit den 5'-hydroxyl- und aminogeschützten, natürlichen Nucleosiden zur Reaktion gebracht werden konnten (Kap. 6). Die modifizierten Phosphoramidite wurden so in guter Ausbeute erhalten.

Die Phosphoramidit-Bausteine wurden mittels der Oligonucleotid-Festphasensynthese selektiv, an verschiedenen Positionen in sehr guten Ausbeuten in Modell-Oligonucleotide eingebaut (Kap. 7). Als Sequenzen wurden die Hexamere 5'-d(GCCGCG) **S01** und 5'-d(CGCGCG) **S40** sowie das Dodecamer 5'-d(CAGGTCAATCAT) **S20** gewählt. Die Stränge wurden zunächst nur jeweils einfach modifiziert, um die Veränderungen der Eigenschaften besser charakterisieren zu können. Bei den Hexameren **S01** und **S40** wurde die mittlere Phosphatbrücke modifiziert. Im Falle des Dodecamers **S20** wurden die mittlere Position, die vorletzte Position des 3'-Endes oder die sich am 5'-Ende befindende Phosphatbrücke modifiziert. Die Entschützung der Oligonucleotide konnte in den meisten Fällen mit konz. Ammoniak durchgeführt werden, da die Arylalkylphosphonate eine signifikant geringere Basenlabilität aufwiesen als die literaturbekannten Methylphosphonate. Die Aufreinigung der DNA-Stränge erfolgte durch RP-HPLC. In einem zweiten Schritt konnten die erhaltenen diastereoisomeren Oligonucleotide ebenfalls mittels RP-HPLC getrennt werden.

Die einfach modifizierten, diastereoisomerenreinen Oligonucleotide wurden mittels RP-HPLC auf ihre Lipophilie hin untersucht. Dabei wurde eine signifikante Verlängerung der Retentionszeiten, die ein Maß für die Lipophilie darstellt, von den Arylalkylphosphonaten zu den unmodifizierten Oligonucleotiden sowie zu den Phosphorthioaten festgestellt (Kap. 8.4). Die Lipophilie nahm bei der Verlängerung der Alkylkettenlänge und der Vergrößerung des aromatischen Ringsystems pro (CH₂)-Gruppe sowie pro weiterem Sechsring in konstanten Schritten zu. Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, die Lipophilie von Oligonucleotiden mittels Arylalkyl-Rückgratmodifikationen gezielt zu beeinflussen und zu steuern.

Um den Einfluss der Modifikationen im Doppelstrang zu untersuchen wurden die isomerenreinen Oligonucleotide mit dem Gegenstrang hybridisiert und die T_m-Werte der Duplexe bestimmt. Ferner wurden die Doppelstränge auch CD- und Fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die erhaltenen Daten führten zu folgenden Rückschlüssen und Gesetzmäßigkeiten:

*a) Modifikationen mit einer Alkylkettenlänge von einer (CH₂)-Gruppe: **B, I, M, N, O, P, Q***

- Die Duplexe mit einer Rp-konfigurierten Phosphatbrücke zeigen immer höhere T_m-Werte als jene mit einer Sp-konfigurierten Phosphateinheit (Tab. 8.1).
- Im Falle der mittleren Modifikationsstelle weisen die Rp-konfigurierten Benzylphosphonate (**B**), (Naphth-1-yl)methylphosphonate (**I**) und 2,4-Difluorbenzylphosphonate (**M**) einen höheren T_m-Wert auf als die unmodifizierten Duplexe. Ursache hierfür ist eine starke π - π -Wechselwirkung zwischen den Aromaten der Modifikation und dem Phosphatrückgrat. In Anwesenheit von voluminösen Substituenten in para-Stellung des Aromaten, wie im Falle der p-Methylbenzylphosphonate (**O**) und p(*t*-Butyl)benzylphosphonate (**Q**) nimmt der T_m-Wert beider Isomere signifikant ab (Tab. 8.2). Dies ist auf die gestörte Wechselwirkung – hervorgerufen durch den sterisch anspruchsvolleren Substituenten - zwischen dem Aromaten und dem Duplex zurückzuführen.
- Je weiter die Modifikationen am Ende der Duplexe platziert sind, desto niedriger sind die T_m-Werte im Falle der Rp-konfigurierten Isomere. Im Gegensatz dazu kommt es bei den Sp-konfigurierten Doppelsträngen zu einer Erhöhung der Schmelzpunkte. Im Falle der am 5'-Ende modifizierten Duplexe sind die T_m-Werte der unterschiedlich konfigurierten Duplexe nahezu identisch (Tab. 8.4).
- Alle modifizierten Duplexe weisen in ihren CD-Spektren den typischen Verlauf einer B-Helix auf. Die Intensität der positiven Elliptizität, die ein Maß für die Stärke der π - π -Wechselwirkung (base stacking) darstellt, steht dabei in guter Korrelation mit den gemessenen Schmelzpunkten. Ein stabilerer Duplex führt dabei zu einer stärkeren Intensität der Elliptizität (Kap. 8.3).

b) Modifikationen mit einer Alkylkettenlänge von zwei oder mehr (CH₂)-Gruppen:

- Im Gegensatz zu den Modifikationen mit einer (CH₂)-Gruppe zeigen die Duplexe mit einer Sp-konfigurierten Gruppe an der Phosphatbrücke immer höhere T_m-Werte als jene mit einer Rp-konfigurierten Phosphateinheit (Tab. 8.1). Dies hängt damit zusammen, dass die Sp-konfigurierten Modifikationen bei größerer Kettenlänge in der Lage sind attraktive π - π -Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat einzugehen.
- Alle an der mittleren Position modifizierten Duplexe weisen einen niedrigeren T_m-Wert auf als das unmodifizierte Pendant. Die Verlängerung der Alkylkettenlänge von zwei (CH₂)-Gruppen auf fünf (CH₂)-Gruppen hat nur noch einen geringen Einfluss auf die Schmelzpunkte. Die Vergrößerung des Ringsystems führt hingegen zu einer Erniedrigung des T_m-Wertes.

- Je weiter die Modifikationen am Ende der Duplexe positioniert sind, desto höher sind die erhaltenen T_m -Werte. Im Falle der am 5'-Ende 3-phenylpropyl-, 3-(naphth-1-yl)propyl- und 3-(anthracen-9-yl)propylmodifizierten Duplexe **E**, **J**, **K** kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Schmelzpunktes, was auf einen „Dangling-End-Effekt“ zurückzuführen ist. Dieser ist umso ausgeprägter je größer das Ringsystem ist (Tab. 8.4).
- Fluoreszenzmessungen führten im Falle der endmodifizierten 3-(Anthracen-9-yl)propylphosphonate (**K**) zu einer deutlichen Löschung der Fluoreszenz-Intensität vom Einzelstrang zum Doppelstrang, was einen eindeutigen Beweis für den „Dangling-End-Effekt“ darstellt (Kap. 8.2).
- In einer weiteren Untersuchung konnte die Möglichkeit aufgezeigt werden, Duplexe die eine Ausbuchtung beinhalten, durch längerkettige Arylalkyl-Rückgratmodifikationen zu stabilisieren (Kap. 8.1.3).

Für die Zuordnung der absoluten Konfiguration der Modifikationen in Oligonucleotiden wurde die empirische Regel zugrunde gelegt, dass das rascher eluierende Isomer bei der RP-HPLC-Trennung Rp-konfiguriert und das langsamer eluierende Isomer Sp-konfiguriert ist. Zudem weisen die Rp-konfigurierten Isomere im ^{31}P -NMR-Spektrum stets die hochfeldigere chemische Verschiebung auf. Um diese Gesetzmäßigkeit zu bestätigen, wurden drei 3-phenylpropylmodifizierte Dimere synthetisiert und untersucht. Im Falle der Methylphosphonat-Dimere konnte die absolute Konfiguration zudem mittels 2D-NMR-ROESY Messungen bestimmt werden. Die Ergebnisse der diastereomerenreinen 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere bestätigten die empirischen Regeln. Die bei den Methylphosphonaten gefundenen ROESY-NMR-Charakteristika konnten auf die 3-Phenylpropylphosphonat-Dimere übertragen werden (Kap. 9). Die Interpretationen wurden jedoch aufgrund der vorliegenden diasteriotopen Methylenprotonen der 3-Phenylpropylgruppe und durch die Überlagerung einiger relevanter Signale erschwert. Fasst man die erhaltenen Daten zusammen kann die Zuordnung der absoluten Konfiguration eindeutig erfolgen. Wie im Falle der Methylphosphonate ist bei den 3-Phenylpropylphosphonaten das von der RP-HPLC-Säule rascher eluierende Isomer Rp-konfiguriert und das langsamer eluierende Isomer Sp-konfiguriert.

Neben den Untersuchungen der Charakteristika der Arylalkyl-Rückgrat modifizierten Oligonucleotide wurden während dieser Arbeit einige Modifikationen gezielt auf ihre

Einsetzbarkeit für den Antisense-Einsatz getestet. Als RNA-Zielsequenz wurden die Nucleotide 326-342 der 5'-nicht codierenden Region des Hepatitis C Virus gewählt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sechsfach terminal 2-phenylethyl-, 4-phenylbutyl- und 2,4-difluorbenzylmodifizierten 17mer Antisense-Oligonucleotide **D**, **F** und **M** synthetisiert und untersucht. Zu Vergleichszwecken wurde zusätzlich das benzylmodifizierte 17mer (**B**) und das entsprechende Phosphorthioat (**ps**) dargestellt. Die arylalkylmodifizierten Oligonucleotide zeigten gute Hybridisierungseigenschaften gegenüber der sense-DNA bzw. sense-RNA und eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber der Nuclease P1 (Kap. 10.2, 10.5). Ferner konnte die Lipophilie der Oligonucleotide durch die 2-Phenylethyl- und 4-Phenylbutylmodifikationen (**D**) und (**F**) signifikant gesteigert werden (Kap. 10.4). Die 2-Phenylethylphosphonate (**D**) und 2,4-Difluorbenzylphosphonate (**M**) sind zudem in der Lage die RNase H zu aktivieren (Kap. 10.6).

Alle dargestellten Antisense-Oligonucleotide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Caselmann an der Rheinischen Friedrich Wilhelms-Universität in Bonn in einem dort entwickelten zellfreien *in vitro*- sowie in einem *in vitro*-Zellkultur-Translations-Assay auf ihr Inhibierungspotential gegen die Hepatitis C Virus Genexpression getestet. Dabei zeigten die Benzylphosphonate (**B**), Phosphorthioate (**ps**) und die 2-Phenylethylphosphonate (**D**) im zellfreien *in vitro* Testsystem hohe, spezifische Inhibierungsraten (>87%), bei einer Oligonucleotid-Konzentration von 5 μ M (Kap. 10.6). Auch erwiesen sich die arylalkylmodifizierten Antisense-Oligonucleotide, mit Ausnahme der 4-Phenylbutylphosphonate **F**, als sehr gute Inhibitoren der HCV-Genexpression in CCI13-Zellen (Kap. 10.7). Die erzielten Inhibierungsraten lagen dabei knapp über den Werten die durch die Phosphorthioate erreicht werden konnten.

12 Experimenteller Teil

12.1 Allgemeines

Eingesetzte Lösungsmittel für die Chromatographie

- Essigester; technische Qualität, wurde über CaCl_2 getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Methanol; technische Qualität, wurde über CaCl_2 getrocknet und destilliert
- Methylenchlorid; technische Qualität, wurde über CaCl_2 getrocknet und destilliert
- Triethylamin; p.a.
- Tetrahydrofuran; p.a. über Molekularsieb
- Diethylether; p.a. über Natrium getrocknet und destilliert sowie über Na-Draht gelagert
- Benzol, p.a.
- Chloroform, p.a.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische DC wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit dem Fluoreszenzindikator F_{254} (Schichtdicke 0,2 mm; Merck Nr. 5554) verwendet. Die Platten wurden vor Gebrauch auf eine Größe von $2-8 \times 10$ cm zugeschnitten. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Verbindungen, die eine 4,4'-Dimethoxytritylgruppe tragen, konnten durch Überleiten von Salzsäuredämpfen bzw. durch Erhitzen mittels eines Heißluftföns detektiert werden.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Für die präparative Dünnschichtchromatographie (Fliehkraft-Chromatographie) wurde ein Chromatotron der Fa. Harrison Research (Modell 7924T) verwendet. Als Trennmaterial diente hierbei gipshaltiges Kieselgel (Merck 60 PF₂₅₄, Nr. 7749), das in Schichtdicken von 1, 2 bzw. 4 mm auf entsprechende Glasplatten (Durchmesser 20 cm) aufgetragen wurde. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgt bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)

Die Säulenchromatographie (Still et al., 1978) wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 μm , Merck Nr. 9385) als Trennmaterial durchgeführt. Es standen Säulen verschiedener Durchmesser zur Verfügung ($d = 1-15$ cm). Die Trennungen wurden entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt (Kap. 12.1.2).

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung und Diastereoisomerentrennung der nasschemisch synthetisierten Dimere erfolgte an einer Normalphasen-HPLC (Merck Sep Tech, präparative Säule: Nucleoprep von Macherey & Nagel; 100-20; 430×50 mm; Fluß: 100 ml/min). Die Elutionsmittel zur Aufreinigung wurden jeweils auf das Trennproblem hin optimiert.

NMR-Spektroskopie

Die Spektren wurden an Geräten AM 250, WH 270, AMX 400 und AMX 600 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Als Lösungsmittel wurden (d_6)-DMSO mit $\delta = 2,49$ ppm und CDCl_3 mit $\delta = 7,27$ ppm für die ^1H -NMR-Spektren sowie (d_6)-DMSO mit $\delta = 39,5$ ppm

und CDCl_3 mit $\delta = 77,0$ ppm für die ^{13}C -NMR-Spektren verwendet. Die Verschiebung der ^{31}P -NMR-Signale wurde gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure angegeben. ^{31}P -NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von 162 MHz Breitband entkoppelt aufgenommen. Die Temperatur betrug bei allen Messungen 300 K.

UV/VIS- Spektroskopie

UV-Spektren wurden an einem UV- Spektralphotometer der Firma Varian (Modell Cary 1) aufgenommen.

Massenspektrometrie: ESI

Die Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma VG-Analytical und VG Biotec (heute: Micro-mass) aufgenommen. Für die Elektrospray-Ionisation (ESI) stand eine VG Platform II mit Quadrupol-Analysator der Firma Fisons zur Verfügung.

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

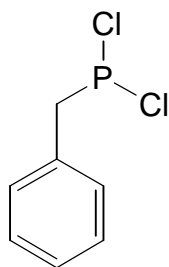
Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktapparatur nach Tottoli der Firma Büchi (Modell Büchi 510) gemessen. Die Werte wurden nicht korrigiert.

12.2 Synthese der Einzelverbindungen

Benzyldichlorphosphan 4

Literatur: Samstag, 1992; Samstag, 1994; Lehmann, 2001



C₇H₇Cl₂P [193,01]

Durchführung

Alle Apparaturen und Kolben, die während dieser Reaktion zum Einsatz kamen, wurden ausgeheizt und mit Argon geflutet. Zu 2,11 g Mg-Spänen (87 mmol) wurde innerhalb von 30 min portionsweise 10 ml Benzylchlorid **1** (86,9 mmol), welches in 100 ml abs. Ether gelöst war, zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 2h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde zu der erhaltenen Grignard-Lösung 7,96 g CdCl₂ (43,5 mmol; 24h in einer Trockenpistole im Vakuum (10⁻¹ mbar) über P₂O₅ getrocknet) gegeben und 1h bei 0°C und anschließend 1h bei Raumtemperatur gerührt. Das Salz wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt und die klare Lösung innerhalb einer Stunde zu einer auf -78°C (Aceton/fl. N₂) abgekühlten Mischung aus 53,1 ml PCl₃ (608 mmol) und 100 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur. Das ausgefallene CdCl₂ wurde ebenfalls über eine Schlenkfritte abgetrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Der Ether sowie überschüssiges PCl₃ wurden im Membranpumpenvakuum abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Verbindung **4** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 10,47 g (62%)

Alternative Durchführung

Auch hier wurden alle Apparaturen und Kolben, die während dieser Reaktion zum Einsatz kamen, ausgeheizt und mit Argon geflutet. Zu einer Lösung aus 5 ml Benzylchlorid **1** (43,4 mmol) und 30 ml abs. THF wurde innerhalb von 30 min bei -78°C 27,1 ml 1,5 M *t*-BuLi in Hexan (43,4 mmol) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde langsam (1 Stunde) auf RT erwärmt und weitere 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde zu der erhaltenen Lösung 3,98 g CdCl_2 (21,7 mmol; 24h in einer Trockenpistole im Vakuum (10^{-1} mbar) über P_2O_5 getrocknet) gegeben und 1h bei 0°C und anschließend 1h bei Raumtemperatur gerührt. Die klare Lösung wurde innerhalb einer Stunde zu einer auf -78°C (Aceton/fl. N_2) abgekühlten Mischung aus 26,5 ml PCl_3 (304 mmol) und 40 ml abs. THF getropft. Das THF sowie das überschüssige PCl_3 wurde abdestilliert und der Rückstand (Salze und Benzyldichlorphosphan **4**) in 20 ml abs. Diethylether aufgenommen. Die unlöslichen Salze wurden über eine Schlenkfritte unter Argonatmosphäre abgetrennt. Der Diethylether wurde im Membranpumpenvakuum abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Verbindung **4** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 4,11 g (49%)

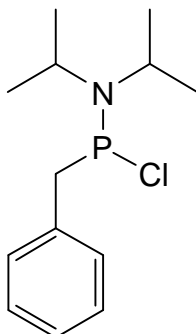
Sdp.: 75°C (10^{-1} mbar)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.41-7.29 (m, 5H, arom. H); 3.73 (d, 2H, $^2J=15.3$ Hz, $-\text{CH}_2-$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
179.74

Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan 5

Literatur: Lehmann, 2001; Caruthers, 1987



C₁₃H₂₁ClNP [257,74]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 10,47 g Benzylchlorphosphan **4** (54,3 mmol) wurden in 50 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst. Bei einer Temperatur von –30°C (Aceton/fl. N₂) wurde innerhalb von 1 Stunde 15,24 ml *N,N*-Diisopropylamin (108,6 mmol) zugetropft. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur kommen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit 30 ml abs. CH₂Cl₂ gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 7,65 g (55%)

Sdp.: 91°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7.26-7.19 (m, 5H, arom. H); 3.48 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 3.41 (m, 2H, CH-ⁱPr);

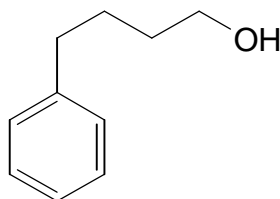
1.25 (m, 12H, -CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃);

135.29

4-Phenyl-1-butanol **12**

Literatur: Searles, 1951



C₁₀H₁₄O [150,22]

50,0 g Benzylchlorid **1** (395 mmol), gelöst in 200 ml abs. Ether, wurden unter Argon-Atmosphäre auf 9,60 g Mg-Späne (395 mmol) getropft. Nach der vollständigen Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Zur abgekühlten Grignard-Lösung wurden 23,23 g Trimethylenoxid (400 mmol) getropft und 4h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit ges. NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert. 4-Phenyl-1-butanol **12** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 39,6 g (67%)

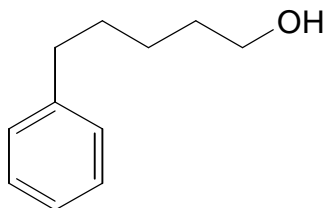
Sdp.: 107°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
7.24-7.07 (m, 5H, arom. H); 4.41 (t, 1H, ³J=5.8 Hz, -OH); 3.58 (q, 2H, CH₂-OH); 2.58 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, C₆H₅-CH₂); 1.66-1.48 (m, 4H, -CH₂-CH₂-)

ESI-MS(-): berechnet: 149.2 m/z (M-H)⁻
gefunden: 148.9 m/z (M-H)⁻

5-Phenyl-1-pentanol **13**

Literatur: Oae, 1953



C₁₁H₁₆O [164,24]

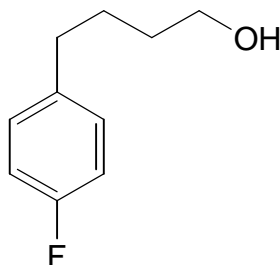
20,0 g 2-Phenylethylbromid **7** (108 mmol), gelöst in 100 ml abs. Ether, wurden unter Argonatmosphäre auf 2,62 g Mg-Späne (108 mmol) getropft. Nach der vollständigen Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Zur abgekühlten Grignard-Lösung wurden 5,81 g Trimethylenoxid (100 mmol) getropft und 2h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde mit 200 ml abs. Benzol versetzt und weitere 4h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit ges. NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert. 5-Phenyl-1-pentanol **13** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 11,6 g (65%)

Sdp.: 115°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
7.29-7.11 (m, 5H, arom. H); 4.33 (t, 1H, ³J=5.1 Hz, -OH); 3.35 (q, 2H, CH₂-OH); 2.53 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, C₆H₅-CH₂); 1.63-1.23 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-)

ESI-MS(-): berechnet: 163.2 m/z (M-H)⁻
gefunden: 163.0 m/z (M-H)⁻

4-(4-Fluorphenyl)-1-butanol 14**C₁₀H₁₃FO [168,21]**

10,0 ml 4-Fluorbenzylbromid **8** (80,3 mmol), gelöst in 50 ml abs. Ether, wurden unter Argonatmosphäre auf 1,94 g Mg-Späne (80,3 mmol) getropft. Nach der vollständigen Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Zur abgekühlten Grignard-Lösung wurden 9,29 g Trimethylenoxid (160 mmol) getropft und 6h unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen wurde mit ges. NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde fraktioniert destilliert. 4-(4-Fluorphenyl)-1-butanol **14** wurde als klare Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 8,86 g (66%)

Sdp.: 77°C (10⁻¹ mbar)

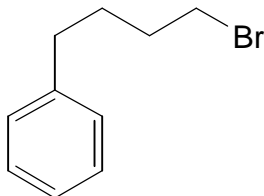
DC: R_f = 0,31 (*n*-Hexan/Essigester 2:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

7.26-7.15 (m, 2H, arom. H); 7.11-7.02 (m, 2H, arom. H); 4.40 (b, 1H, -OH); 3.42 (t, 2H, ³J=6.3 Hz; C₆H₅-CH₂-); 2.58 (q, 2H, CH₂-OH); 1.62-1.53 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-CH₂-); 1.49-1.41 (m, 2H, -CH₂-CH₂-OH)

4-Phenyl-1-brombutan **15**

Literatur: Oae, 1953



C₁₀H₁₃Br [213,11]

25,0 g 4-Phenyl-1-butanol **12** (166 mmol) wurden mit 85 ml 48%iger HBr-Lösung sowie 250 mg rotem Phosphor versetzt und 6h unter Rückfluss gekocht. Danach wurden 12 ml konz. H₂SO₄ portionsweise zugetropft und weitere 12h zum Sieden erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde auf das doppelte Volumen Wasser gegeben und die org. Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit 5%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Das Produkt **15** wurde als hellgelbe Flüssigkeit nach fraktionierter Destillation erhalten.

Ausbeute: 22,73 g (64%)

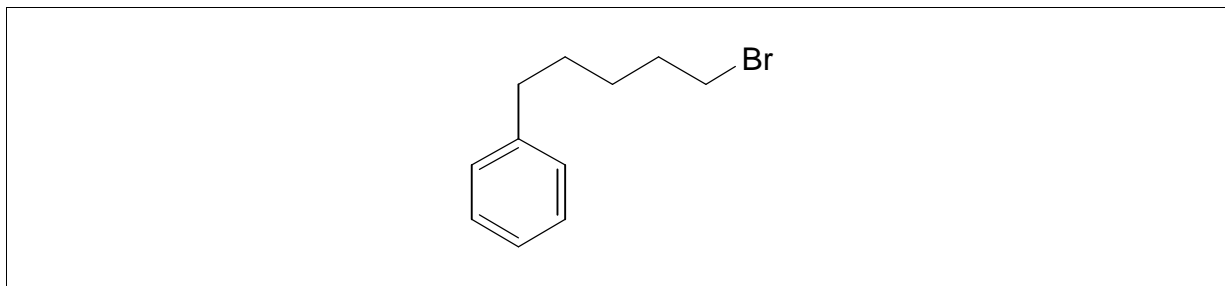
Sdp.: 100°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
7.22-7.06 (m, 5H, arom. H); 3.28 (t, 2H, ³J=6.2 Hz, -CH₂-Br); 2.54 (t, 2H, ³J=6.5 Hz, C₆H₅-CH₂); 1.85-1.70 (m, 4H, -CH₂-CH₂-)

ESI-MS(-): berechnet: 212.1 m/z (M-H)⁻
gefunden: 211.1 m/z (M-H)⁻

5-Phenyl-1-brompentan **16**

Literatur: Huisgen, 1954



C₁₁H₁₅Br [227,14]

25,0 g 5-Phenyl-1-pentanol **13** (153 mmol) wurden mit 75 ml 48%iger HBr-Lösung sowie 250 mg rotem Phosphor versetzt und 6h unter Rückfluss gekocht. Danach wurden 11 ml konz. H₂SO₄ portionsweise zugetropft und weitere 6h zum Sieden erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde auf das doppelte Volumen Wasser gegeben und die org. Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit 5 ml konz. H₂SO₄ und 5%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Das Produkt **16** wurde als hellgelbe Flüssigkeit nach fraktionierter Destillation erhalten.

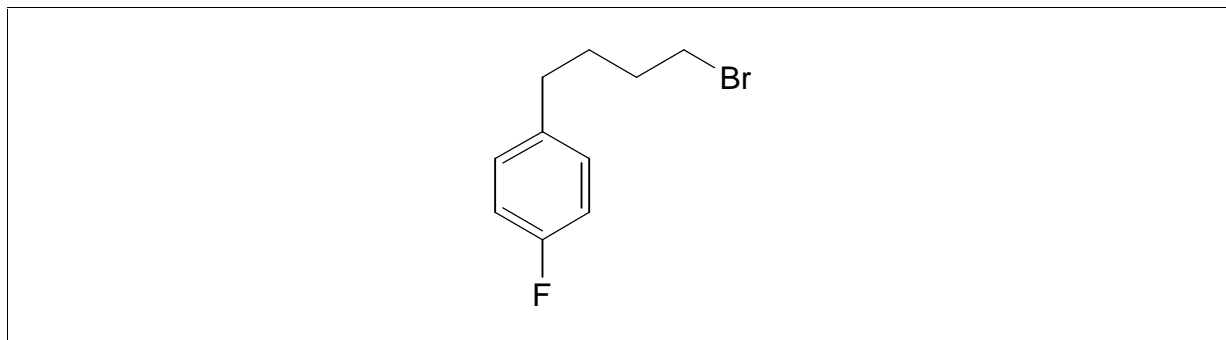
Ausbeute: 23,3 g (67%)

Sdp.: 115°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
7.33-7.16 (m, 5H, arom. H); 3.43 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, -CH₂-Br); 2.64 (t, 2H, ³J=7.3 Hz, C₆H₅-CH₂-); 1.96-1.85 (m, 2H, -CH₂-CH₂-Br); 1.73-1.61 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-CH₂-); 1.57-1.43 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-Br)

ESI-MS(-): berechnet: 226.1 m/z (M-H)⁻
gefunden: 226.4 m/z (M-H)⁻

4-(4-Fluorphenyl)-1-brombutan **17**



C₁₀H₁₂BrF [231,10]

8,80 g 4-(4-Fluorphenyl)-1-butanol **14** (52,3 mmol) wurden mit 30 ml 48%iger HBr-Lösung sowie 250 mg rotem Phosphor versetzt und 6h unter Rückfluss gekocht. Danach wurden 3 ml konz. H₂SO₄ portionsweise zugetropft und weitere 14h zum Sieden erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde auf das doppelte Volumen Wasser gegeben und die org. Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit 5%iger NaHCO₃-Lösung gewaschen, mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Das Produkt **17** wurde als farblose Flüssigkeit nach fraktionierter Destillation erhalten.

Ausbeute: 9,23 g (76%)

Sdp.: 94°C (10⁻¹ mbar)

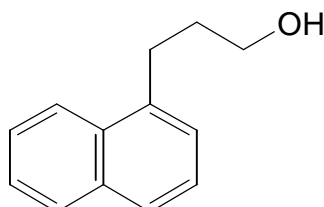
DC: R_f = 0,40 (*n*-Hexan)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

7.27-7.20 (m, 2H, arom. H); 7.13-7.03 (m, 2H, arom. H); 3.53 (t, 2H, ³J=6.4 Hz; C₆H₅-CH₂-); 2.59 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, -CH₂-Br); 1.81-1.75 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-CH₂-); 1.71-1.63 (m, 2H, -CH₂-CH₂-Br)

3-(1-Naphthyl)-propanol **19**

Literatur: Searles, 1951



C₁₃H₁₄O [186,25]

40,0 g 1-Bromnaphthalin **18** (193 mmol), gelöst in 200 ml abs. Ether, wurden unter Argonatmosphäre auf 4,61 g Mg-Späne (190 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erhitzen mittels eines Heissluftföns gestartet. Nach vollständigen Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Zur abgekühlten Grignard-Lösung wurden 6,7 g Trimethylenoxid (115 mmol) getropft und 4h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde mit 250 ml abs. Benzol versetzt und weitere 6h erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde mit ges. NH₄Cl-Lösung hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde mit Ether extrahiert und die vereinigten org. Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Das Produkt **19** (gelbliche Flüssigkeit) wurde nach Säulenchromatographie an Kieselgel (Gradient: CH₂Cl₂/MeOH 99:1) erhalten.

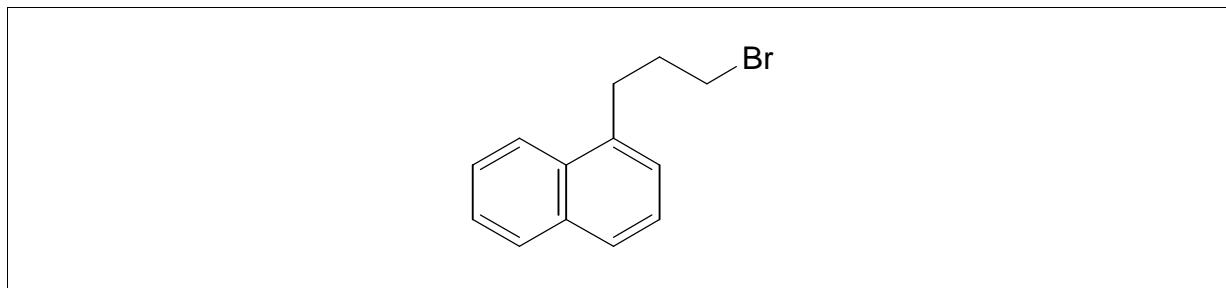
Ausbeute: 17,8 g (49%)

DC: R_f = 0,18 (CH₂CH₂)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

8.10 (m, 1H, arom. H); 7.90 (m, 1H, arom. H); 7.75 (m, 1H, arom. H); 7.58-7.34 (m, 4H, Arom. H); 4.58 (t, 1H, ³J=5.2 Hz, -OH); 3.51 (q, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂-OH); 3.07 (t, 2H, ³J=7.7 Hz, C₆H₅-CH₂); 1.88-1.76 (m, 2H, -CH₂-CH₂-OH)

1-(3-Brompropyl)naphthalen **20**



C₁₃H₁₃Br [249,15]

13,3 g 3-(1-Naphthyl)propanol **19** (83,7 mmol) und 72,5 g Tetrabrommethan (218 mmol) wurden in 200 ml abs. Ether gelöst und bei 0°C mit 52,7 ml Tri-*n*-octylphosphin (143 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 20h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand chromatographiert (Laufmittel: *n*-Hexan). Das Produkt **20** wurde als hochviskose hellgelbe Flüssigkeit erhalten.

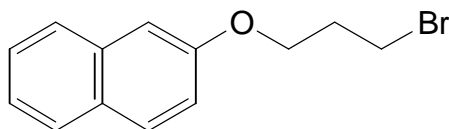
Ausbeute: 13,6 g (77%)

DC: R_f = 0,17 (*n*-Hexan)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)
8.11 (m, 1H, arom. H); 7.93 (m, 1H, arom. H); 7.78 (m, 1H, arom. H); 7.59-7.35 (m, 4H, arom. H); 3.60 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂-Br); 3.16 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, C₆H₅-CH₂); 2.17 (m, 2H, -CH₂-CH₂-Br).

3-(2-Naphthoxy)propylbromid 22

Literatur: Tada, 1990



C₁₃H₁₃BrO [265,15]

4,3 g 2-Naphthol **21** (30 mmol), 1,87 g KOH (48 mmol) und 18,2 g 1,3-Dibrompropan (90 mmol) wurden in 20 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur 36h gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der Rückstand bis zu einem pH-Wert von 5,0 mit 1 M HCl versetzt. Die Lösung wurde mit Methylenchlorid extrahiert und die vereinigten org. Phasen mit 5%iger wässriger NaHCO₃-Lösung sowie mit Wasser gewaschen. Es wurde mit Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel wie auch überschüssiges Dibrompropan abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Gradient: *n*-Hexan/Essigester 6:1).

Ausbeute: 4,05 g (51%)

DC: R_f = 0,49 (*n*-Hexan/Essigester 6:1)

Sdp.: 112°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, (d₆)-DMSO)

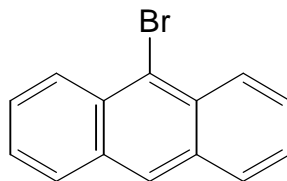
7.82 (m, 3H, arom. H); 7.46 (m, 1H, arom. H); 7.34 (m, 2H, arom. H); 7.17 (m, 1H, arom. H); 4.20 (t, 2H, ³J=6.0 Hz, O-CH₂-); 3.72 (t, 2H, ³J=6,6 Hz, CH₂-Br); 2.32 (qt, 2H, ³J=6.3 Hz; -CH₂-CH₂-Br)

ESI-MS(+): berechnet: 266.2 m/z (M+H)⁺

gefunden: 267.1 m/z (M+H)⁺

9-Bromanthracen **24**

Literatur: Buu-Hoi, 1944



C₁₄H₉Br [257,13]

9,0 g Anthracen **23** (50,5 mmol) wurden in 50 ml CCl₄ gelöst und mit 9,0 g *N*-Bromsuccinimid (50,5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 90 min unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das ausgefallene Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der feste Rückstand wurde über einen Säbelkolben destilliert. 9-Bromanthracen **24** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 10,0 g (77%)

DC: R_f = 0,27 (*n*-Hexan)

Smp.: 102°C

Sdp.: 162°C

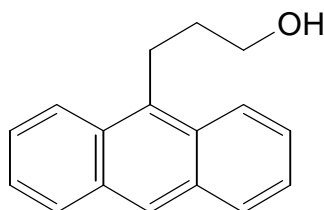
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

8.55-8.44 (m, 3H, arom. H); 7.98 (m, 2H, arom. H); 7.64-7.45 (m, 4H, arom. H)

ESI-MS(+): berechnet: 258.1 m/z (M+H)⁺

gefunden: 258.2 m/z (M+H)⁺

9-(3-Hydroxypropyl)anthracen **25**



C₁₇H₁₆O [236,31]

8,0 g 9-Bromanthracen **24** (31 mmol) wurden in 50 ml wasserfreiem Ether gelöst und unter Argonatmosphäre bei -78°C (Aceton/N₂ fl.) mit 18,7 ml 1,5 M *n*-BuLi in Hexan (30 mmol) versetzt. Man liess die Lösung innerhalb von 1h auf 0°C kommen und versetzte diese mit 2,36 ml Trimethylenoxid (35 mmol). Es wurde 2h unter Rückfluss gekocht, danach mit 70 ml Benzol versetzt und weitere 4h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung mit ges. Ammoniumchloridlösung (100 ml) hydrolysiert und die wässrige Phase mit Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Das Produkt **25** wurde nach FC an Kieselgel (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigester 4:1) als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,0 g (32%)

DC: R_f = 0,46 (*n*-Hexan/Essigester 2:1)

Smp.: 98°C

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

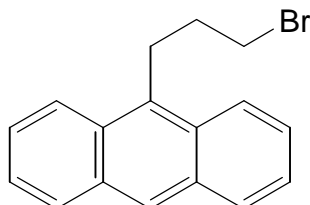
8.45-8.34 (m, 3H, arom. H); 8.05 (m, 2H, arom. H); 7.58-7.47 (m, 4H, arom. H); 4.71 (t, 1H, ³J=5.1 Hz, -OH); 3.68-3.59 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-O); 1.87 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-O)

ESI-MS(+): berechnet: 237.3 m/z (M+H)⁺

gefunden: 237.1 m/z (M+H)⁺

9-(3-Brompropyl)anthracen **26**

Literatur: Hooz, 1968



C₁₇H₁₅Br [299,20]

6,21 g 9-(3-Hydroxypropyl)anthracen **25** (26,3 mmol) und 20,63 g Tetrabrommethan (62,3 mmol) wurden in 100 ml abs. Ether gelöst und bei 0°C mit 27,4 ml Tri-*n*-octylphosphin (61,5 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 20h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand chromatographiert (*n*-Hexan/Essigester 6:1). Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,75 g (86%)

DC: R_f = 0,55 (*n*-Hexan/Essigester 4:1)

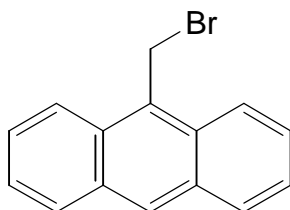
Smp.: 91°C

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

8.22 (m, 3H, Arom. H); 7.91 (m, 2H, Arom. H); 7.48-7.35 (m, 4H, Arom. H); 3.71 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, C₆H₅-CH₂); 3.52 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂-Br); 2.32 (m, 2H, CH₂-CH₂-Br)

9-(Brommethyl)anthracen **28**

Literatur: Tung, 1998



C₁₅H₁₁Br [271,15]

25 g 9-Methylantracen **27** (130 mmol) wurden in 500 ml CCl₄ gelöst und mit 23,14 g *N*-Bromsuccinimid (130 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 24h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das ausgefallene Succinimid abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Nach Umkristallisation aus Chloroform/Petrolether 1:1 wurde 9-(Brommethyl)anthracen **28** in kristalliner Form erhalten (gelbe Nadeln).

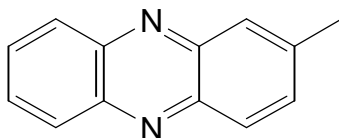
Ausbeute: 26,4 g (75%)

Smp.: 198°C

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
8.41 (s, 1H, H10); 8.22 (d, 2H, ³J=8.5 Hz, H1, H8); 7.95 (d, 2H, ³J=8.3 Hz, H4, H5); 7.56 (m, 2H, arom. H); 7.43 (m, 2H, arom. H); 5.46 (s, 2H, -CH₂-Br)

2-Methylphenazin 31

Literatur: Teuber, 1955



C₁₃H₁₀N₂ [194,23]

3,72 g 4-Methylcatechol **29** (30 mmol) wurden in 300 ml dest. H₂O gelöst, mit 6,73 g Natriumperodat (33 mmol) versetzt und 1 min bei RT gerührt. Die rot-braune Lösung wurde im Anschluß dreimal mit je 70 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden umgehend auf eine Lösung aus 3,24 g 1,2-Diaminobenzol (30 mmol) und 40 ml CH₂Cl₂ gegeben. Zu dieser Mischung wurde innerhalb von 10 min 20 ml konz. Essigsäure zugetropft und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 4h unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung mit 150 ml H₂O, 2 mal mit 150 ml 5%iger NaHCO₃-Lösung sowie mit 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die jeweiligen wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Der Rückstand wurde in wenig CH₂Cl₂ aufgenommen und über eine kurze Alumina-Säule (Alumina Woelm B-Super 1, Wasserzusatz 0%, Laufmittel: CH₂Cl₂) vorgereinigt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der dunkelgelbe Feststoff an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 99:1). 2-Methylphenazin **31** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,63 g (52%)

DC: R_f = 0,32 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

Smp.: 117°C

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

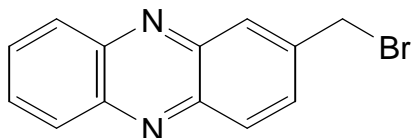
8.29-8.07 (m, 3H, arom. H); 7.92 (s, 1H, arom. H); 7.76-7.59 (m, 3H, arom. H); 2.60 (s, 3H, -CH₃)

ESI-MS(+): berechnet: 195.2 m/z (M+H)⁺

gefunden: 194.7 m/z (M+H)⁺

2-(Brommethyl)phenazin 32

Literatur: Maidwell, 2000



C₁₃H₉BrN₂ [273,13]

11,4 g 2-Methylphenazin **31** (58,7 mmol) wurden in 350 ml CCl₄ gelöst und mit 10,49 g *N*-Bromsuccinimid (58,7 mmol) sowie mit 0,8 g AIBN versetzt. Die Lösung wurde 18h unter Rückfluß gekocht. Das ausgefallene Succinimid konnte nicht abfiltriert werden, da während der Reaktion das Produkt ebenfalls ausfiel. Das Lösungsmittel wurde evaporiert und der Rückstand in 100 ml CHCl₃ aufgenommen und mit Wasser sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Der dunkelgelbe Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 99:1). 2-(Brommethyl)phenazin **32** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 13,72 g (86%)

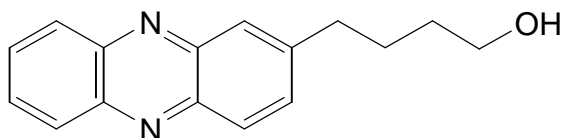
DC: R_f = 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
8.23-8.09 (m, 4H, arom. H); 7.82-7.71 (m, 3H, arom. H); 4.68 (s, 2H, -CH₂-Br)

ESI-MS(+): berechnet: 274.1 m/z (M+H)⁺

gefunden: 274.8 m/z (M+H)⁺

2-(4-Hydroxybutyl)phenazin **33**



C₁₆H₁₆N₂O [252,31]

1,0 g 2-(Brommethyl)phenazin **32** (3,66 mmol) wurden in 40 ml wasserfreiem Toluol gelöst und unter Argonatmosphäre bei -78°C (Aceton/N₂ fl.) mit 2,3 ml 1,5 M *n*-BuLi in Hexan (3,58 mmol) versetzt. Man liess die grün-schwarze Lösung innerhalb von 1h auf 0°C kommen und versetzte diese mit 0,75 ml Trimethylenoxid (11 mmol). Es wurde über Nacht bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Mischung mit ges. Ammoniumchloridlösung (30 ml) hydrolysiert, die org. Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und das Lösungsmittel abdestilliert. Der schwarze Rückstand wurde über FC an Kieselgel (Laufmittel: *n*-Hexan/Essigester 6:1) aufgereinigt. 2-(4-Hydroxybutyl)phenazin **33** wurde als gelbes, viskoses Öl erhalten.

Ausbeute: 210 mg (23%)

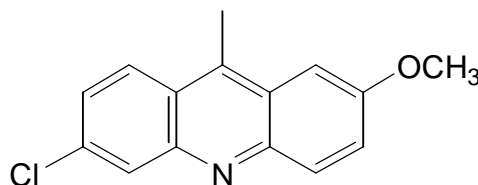
DC: $R_f = 0,46$ (*n*-Hexan/Essigester 2:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

8.28-8.12 (m, 3H, arom. H); 8.00-7.85 (m, 4H, arom. H); 4.41 (t, 1H, ³J=5.4 Hz, -OH); 3.28 (m, 2H, CH₂-OH); 2.88 (t, 2H, ³J=6.1 Hz, C₆H₅-CH₂); 1.74 (m, 4H, -CH₂-CH₂-OH); 1.41 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-CH₂-)

6-Chlor-2-methoxy-9-methylacridin **36**

Literatur: Kurz, 1998



C₁₅H₁₂ClNO [257,71]

3,22 g Natriumhydrid (134 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 15 ml abs. DMSO suspendiert und auf 0°C abgekühlt. Dazu wurde tropfenweise eine Lösung aus 30,1 ml Diethylmalonat (204,5 mmol) und 30 ml abs. DMSO zugetropft. Zu der erhaltenen Reaktionslösung wurden 7,5 g 6,9-Dichlor-2-methoxyacridin **35** (27,3 mmol) gegeben und 2h auf 120°C erhitzt. Im Anschluß wurde die dunkelrote Lösung mit 15 ml H₂O versetzt, wobei das intermediär gebildete 6-Chlor-2-methoxy-9-diethylmalonat-acridin als gelber Niederschlag ausfiel. Zu dieser Mischung wurden bei 0°C 53 ml rauchende Salzsäure gegeben und anschließend 4h auf 100°C erhitzt. Danach wurde die auf 0°C abgekühlte Reaktionslösung auf eine Mischung von 120 ml 6 M NaOH und 200 g Eis gegeben. Im Anschluss wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit 300 ml H₂O und 500 ml Essigester versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach dem Abtrennen der heißen org. Phase fiel das Produkt **36** beim Abkühlen als gelber Niederschlag aus dieser aus.

Ausbeute: 6,13 g (88%)

DC: R_f = 0,34 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

Smp.: 172°C

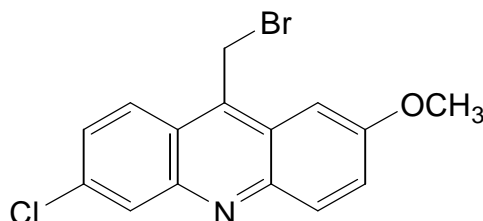
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

8.39 (d, 1H, H8); 8.12 (d, 1H, H5); 8.03 (d, 1H, H4); 7.61 (dd, 1H, H7); 7.58 (m, 1H, H3); 7.50 (m, 1H, H1); 4.00 (s, 3H, O-CH₃); 3.08 (s, 3H, -CH₃)

ESI-MS(+): berechnet: 258.7 m/z (M+H)⁺

gefunden: 257.9 m/z (M+H)⁺

6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37**



C₁₅H₁₁BrClNO [336,61]

2,5 g 6-Chlor-2-methoxy-9-methylacridin **36** (9,7 mmol) wurden in 250 ml CCl₄ gelöst und mit 2,13 g *N*-Bromsuccinimid (11,9 mmol) sowie mit 0,2 g AIBN versetzt. Die Lösung wurde 36h unter Rückfluß gekocht. Das ausgefallene Succinimid konnte nicht abfiltriert werden, da während der Reaktion das Produkt ebenfalls ausfiel. Das Lösungsmittel wurde evaporiert, der Rückstand in 100 ml CHCl₃ aufgenommen und mit Wasser sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Der braune Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 99:1). 6-Chlor-2-methoxy-9-brommethylacridin **37** wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,59 g (79%)

DC: R_f = 0,47 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

Smp.: 190°C

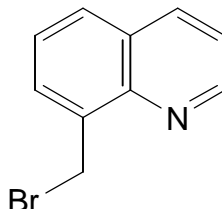
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)
8.44 (d, 1H, H8); 8.18 (d, 1H, H5); 8.07 (d, 1H, H4); 8.11 (dd, 1H, H7); 7.70 (m, 1H, H3); 7.68 (m, 1H, H1); 5.77 (s, 2H, -CH₂-Br); 4.01 (s, 3H, O-CH₃).

ESI-MS(+): berechnet: 337.6 m/z (M+H)⁺

gefunden: 337.8 m/z (M+H)⁺

8-(Brommethyl)chinolin **39**

Literatur: Dalley, 2001



C₁₀H₈BrN [222,08]

25 g 8-Methylchinolin **38** (175 mmol) wurden in 500 ml CCl₄ gelöst und mit 34,2 g *N*-Bromsuccinimid (192 mmol) und 1,0 g Dibenzoylperoxid (4,12 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 12h unter Rückfluß gekocht. Das ausgefallene Succinimid wurde heiß abfiltriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde in 100 ml CHCl₃ aufgenommen und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung sowie mit Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Nach Umkristallisation aus Ethanol wurde 8-(Brommethyl)chinolin **39** in kristalliner Form erhalten (weiße Nadeln).

Ausbeute: 34,7 g (89%)

Smp.: 180°C

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

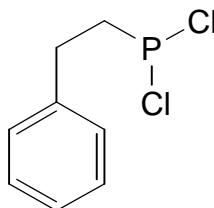
8.03 (d, 1H, arom. H); 8.19 (d, 2H, arom. H); 7.87 (m, 2H, arom. H); 7.51 (m, 2H, arom. H); 5.27 (s, 2H, -CH₂-Br)

ESI-MS(+): berechnet: 223.1 m/z (M+H)⁺

gefunden: 221.8 m/z (M+H)⁺

2-Phenylethyldichlorphosphan 50

Literatur: Collins, 1974



C₈H₉Cl₂P [207,04]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungen wurden unter Argonatmosphäre sowie in ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. 46,4 g 2-Phenylethylbromid **40** (0,25 mol) wurden in 350 ml abs. Diethylether gelöst und auf 6,08 g Mg-Späne (0,25 mol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Heissluftföns gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 1,5h unter Rückfluss gekocht. Die erhaltene Grignard-Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 22,62 g CdCl₂ (0,125 mol; 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅ getrocknet) ummetalliert. Die Lösung wurde 2h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abgetrennt. Die cadmiumorganische Verbindung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N₂) innerhalb von 30 min in eine Mischung von 152,3 g Phosphortrichlorid (1,11 mol) und 100 ml abs. Ether getropft. Das ausgefallene Cadmiumsalz wurde mittels einer Schlenkfritte abgetrennt, wobei der Filterkuchen zweimal mit je 100 ml abs. Ether gewaschen wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittel, wie auch überschüssiges PCl₃ abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 47,2 g (63%)

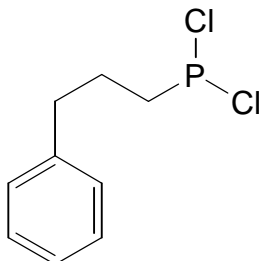
Sdp.: 102°C (10⁻² mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.30 (m, 5H, arom. H); 3.01 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-); 2.64 (m, 2H, -CH₂-P).

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
193.12

3-Phenylpropyldichlorphosphan 51

Literatur: Rowley, 1974



C₉H₁₁Cl₂P [221,06]

Die Reaktion sowie alle Aufarbeitungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. In einer Grignard-Reaktion wurden 40,0 g 3-Phenylpropylbromid **41** (263 mmol), welches in 200 ml abs. Diethylether gelöst war, mit 6,45 g Magnesium-Spänen (265 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Die Lösung wurde nach vollständiger Zugabe noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 24,0 g CdCl₂ (131 mmol, 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅ getrocknet) ummetalliert. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die klare Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N₂) während 45 min auf ein Gemisch aus 56,9 ml PCl₃ (650 mmol) und 70 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 100 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl₃ wurde im Membranpumpenvakuum entfernt und der ölige Rückstand fraktioniert im Ölpumpenvakuum destilliert. Die erhaltene farblose Flüssigkeit zeichnet sich durch einen sehr unangenehmen, beißenden Geruch aus.

Ausbeute: 32,75 g (54%)

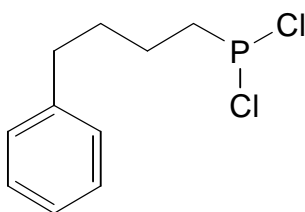
Sdp.: 120°C (10⁻² mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7.29-7.10 (m, 5H, arom. H); 3.45 (t, 2H, $^3J=6.5$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 2.71 (t, 2H, $^3J=7.5$ Hz, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 2.02 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
195.27

4-Phenylbutyldichlorphosphan 52



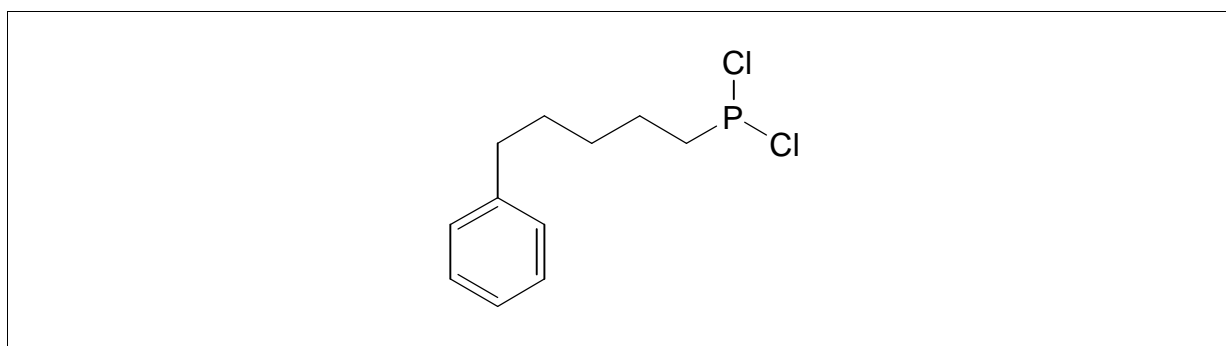
$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{P}$ [235,09]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungen wurden unter Argonatmosphäre sowie in ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. 19,5 g 4-Phenylbutylbromid **15** (91 mmol) wurden in 150 ml abs. Diethylether gelöst und auf 2,26 g Mg-Späne (93 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Heissluftföns gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 3h unter Rückfluss gekocht. Die erhaltene Grignard-Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 8,23 g CdCl_2 (44,9 mmol; 24h im Vakuum (10^{-1} mbar) bei 150°C über P_2O_5 getrocknet) ummetalliert. Die Lösung wurde 2h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das ausgefallene Salz über eine Schlenkfritte abgetrennt. Die cadmiumorganische Verbindung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) innerhalb von 30 min in eine Mischung aus 31 ml Phosphortrichlorid (354 mmol) und 40 ml abs. Ether getropft. Der ausgefallene Niederschlag wurde mittels einer Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit je 30 ml abs. Ether gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel wie auch das überschüssige PCl_3 abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 13,6 g (64%)

Sdp.: 110°C (10^{-3} mbar)
 $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.35 (m, 2H, arom. H); 7.24 (m, 3H, arom. H); 2.72 (t, 2H, $^3J=7.1$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 2.37 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$), 1.84 (m, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$).
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
195.86

5-Phenylpentylchlorphosphan 53



$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{P}$ [267,11]

Alle Apparaturen und Kolben, die während dieser Darstellung zum Einsatz kamen, wurden ausgeheizt und mit Argon geflutet. Zu 2,19 g Mg-Spänen (90 mmol) wurde innerhalb von 30 min portionsweise 20 g 5-Phenylpentylbromid **16** (88 mmol), gelöst in 50 ml abs. Ether, zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 4h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde zu der erhaltenen Grignard-Lösung 8,05 g CdCl_2 (44 mmol; 24h im Vakuum (10^{-1} mbar) über P_2O_5 getrocknet) gegeben und 1h bei 0°C und anschließend 1h bei Raumtemperatur gerührt. Das Salz wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt und die klare Lösung innerhalb einer Stunde zu einer auf -78°C (Aceton/fl. N_2) abgekühlte Mischung aus 30,8 ml PCl_3 (353 mmol) und 50 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur. Die ausgefallenen Salze wurden wiederum über eine Schlenkfritte abgetrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Der Ether sowie überschüssiges PCl_3 wurden im Membranpumpenvakuum

abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Verbindung **53** wurde als klares, zähflüssiges Öl erhalten.

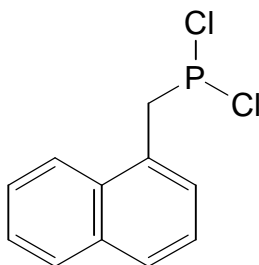
Ausbeute: 10,47 g (62%)

Sdp.: 129°C (10⁻² mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.31-7.15 (m, 5H, arom. H); 3.23 (t, 2H, ³J=7.7 Hz, C₆H₅-CH₂-); 2.48 (t, 2H, ³J=7.8 Hz, -CH₂-P), 1.89-1.61 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-P); 1.50 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-P)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
195.70

[(Naphth-1-yl)methyl]dichlorphosphan **57**



C₁₁H₉Cl₂P [243,07]

Die Reaktion sowie alle Aufarbeitungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Für die Darstellung des Grignard-Reagenzes wurden 32,8 g 1-Chlormethylnaphthalen **56** (186 mmol), welches in 200 ml abs. Diethylether gelöst war, zu 4,51 g Magnesium-Spänen (186 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Die Lösung wurde nach vollständiger Zugabe noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde im Anschluss durch Zugabe von 17,0 g CdCl₂ (93 mmol, 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅

getrocknet) ummetalliert. Nach 2h Rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die klare Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) während 45 min auf ein Gemisch aus 64,9 ml PCl_3 (742 mmol) und 100 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2,5 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl_3 wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

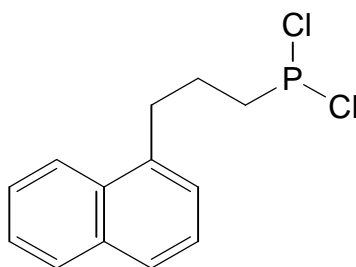
Ausbeute: 26,0 g (57%)

Sdp.: 132°C (10^{-5} mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.08 (m, 1H, arom. H); 7.91 (m, 1H, arom. H); 7.69 (m, 1H, arom. H); 7.63-7.44 (m, 4H, arom. H); 3.50 (2s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
180.51

[3-(Naphth-1-yl)propyl]dichlorphosphan 58



$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{P}$ [271,12]

Die Reaktion sowie alle Aufarbeitungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Für die Darstellung des Grignard-Reagenzes

wurden 8,0 g 1-(3-Brompropyl)naphthalen **20** (32 mmol), das in 50 ml abs. Diethylether gelöst war mit 0,78 g Magnesium-Spänen (32 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns, sowie Zugabe von wenig I_2 gestartet. Die Lösung wurde noch drei Stunden unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 2,93 g $CdCl_2$ (16 mmol, 24h im Vakuum (10^{-1} mbar) bei 150°C über P_2O_5 getrocknet) ummetalliert. Nach 2h rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die klare Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) während 30 min auf ein Gemisch aus 17,4 ml PCl_3 (199 mmol) und 30 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch das überschüssige PCl_3 wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Die Aufreinigung des zähflüssigen Rückstandes mittels Hochvakuumdestillation gelang nicht. Das Produkt **58** zersetzte sich bei einer Temperatur von 140°C. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mittels der 1H - und ^{31}P -NMR-Spektren. Für die folgenden Syntheseschritte wurde das Rohprodukt eingesetzt.

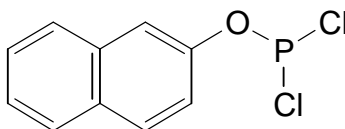
Ausbeute: 3,0 g (34%)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$)
8.05 (m, 1H, arom. H); 7.89 (m, 1H, arom. H); 7.73 (m, 1H, arom. H); 7.57-7.35 (m, 4H, arom. H); 3.07 (m, 2H, $C_6H_5-CH_2-$); 2.20 (m, 2H, $-CH_2-P$); 1.78 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-P$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, $CDCl_3$)
195.46

2-Naphthoxydichlorphosphan 60

Literatur: Kunz, 1894



C₁₀H₇Cl₂OP [245,04]

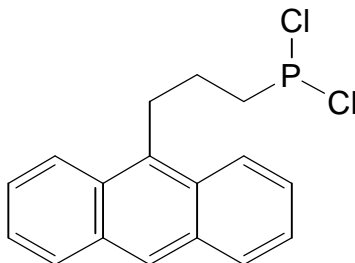
Die Reaktion sowie alle Aufarbeitungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Es wurden 12,7 g 3-(2-Naphthoxy)propylbromid **22** (48 mmol), gelöst in 100 ml abs. Diethylether, mit 1,22 g Magnesium-Spänen (50 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Die Lösung wurde noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 4,6 g CdCl₂ (25 mmol, 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅ getrocknet) ummetalliert. Nach 2h rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die klare Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N₂) während 30 min auf ein Gemisch aus 10,5 ml PCl₃ (120 mmol) und 40 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen 2 mal mit je 30 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl₃ wurde im Membranpumpenvakuum entfernt und der Rückstand fraktioniert im Ölpumpenvakuum destilliert.

Ausbeute: 5,9 g (51%)

Sdp.: 93°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.78-7.16 (m, 7H, arom. H)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
179.31

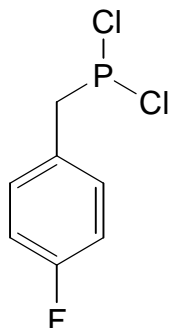
[3-(Anthracen-9-yl)propyl]dichlorophosphan 62**C₁₇H₁₅Cl₂P [321,18]**

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungen wurden unter Argonatmosphäre sowie in ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. 7,0 g 9-(3-Brompropyl)anthracen **26** (22,4 mmol) wurden in 50 ml abs. Diethylether gelöst und auf 0,58 g Mg-Späne (24 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Heissluftföns gestartet. Da die Reaktionsgeschwindigkeit sehr langsam war, wurde nach vollständiger Zugabe noch 12h unter Rückfluss gekocht. Die magnesiumorganische Verbindung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N₂) innerhalb von 2 Stunden in eine Mischung aus 16,9 ml Phosphortrichlorid (192 mmol) und 30 ml abs. Ether getropft. Die ausgefallenen Salze wurden mittels einer Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit je 30 ml abs. Ether gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl₃ abdestilliert. Die Aufreinigung des gelben Feststoffes mittels Hochvakuumdestillation gelang nicht. Das Produkt **62** zersetzte sich bei einer Temperatur von 120°C . Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mittels der ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren.

Ausbeute: 4,06 g (54%)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.33-8.21 (m, 3H, arom. H); 8.01 (m, 2H, arom. H); 7.61-7.43 (m, 4H, arom. H); 3.64 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-); 2.28 (m, 2H, -CH₂-P); 1.93 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
194.78

(4-Fluorbenzyl)dichlorphosphan 68

Die Reaktion sowie alle Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Es wurden 14,41 g 4-Fluorbenzylbromid **63** (76,2 mmol), gelöst in 80 ml abs. Diethylether, mit 1,85 g Magnesium-Spänen (76,2 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Die Lösung wurde noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 6,97 g CdCl₂ (38 mmol, 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅ getrocknet) ummetalliert. Nach 2h Rühren wurde die Lösung bei -78°C (Aceton/fl. N₂) während 40 min auf ein Gemisch aus 26,6 ml PCl₃ (304 mmol) und 700 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von einer Stunde auf RT erwärmen und rührte bei dieser Temperatur noch eine weitere Stunde. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl₃ wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Der ölige Rückstand konnte im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert werden. Die erhaltene farblose Flüssigkeit **68** zeichnete sich durch einen sehr unangenehmen, beißenden Geruch aus.

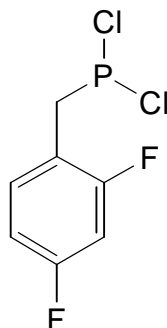
Ausbeute: 10,23 g (64%)

Sdp.: 83°C (10⁻¹ mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.26 (m, 2H, arom. H); 7.08 (m, 2H, arom. H); 3.69 (d, 2H, $^2J=15.9$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
172.99

(2,4-Difluorbenzyl)dichlorphosphan 69



$\text{C}_7\text{H}_5\text{Cl}_2\text{F}_2\text{P}$ [228,99]

Die Reaktion sowie alle Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Es wurden 10,0 g 2,4-Difluorbenzylbromid **64** (48 mmol), welches in 50 ml abs. Diethylether gelöst war mit 1,17 g Magnesium-Spänen (48 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Die Lösung wurde noch eine Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 4,43 g CdCl_2 (24 mmol, 24h im Vakuum (10^{-1} mbar) bei 150°C über P_2O_5 getrocknet) ummetalliert. Nach 2h Rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die klare Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) während 30 min auf ein Gemisch aus 43,7 ml PCl_3 (500 mmol) und 100 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT erwärmen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 60 ml abs. Ether gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl_3 wurde im Membranpumpenvakuum

entfernt und der ölige Rückstand fraktioniert im Membranpumpenvakuum destilliert. Die erhaltene farblose Flüssigkeit zeichnete sich durch einen sehr unangenehmen, beißenden Geruch aus.

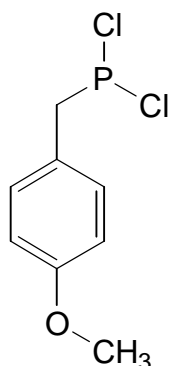
Ausbeute: 7,46 g (67%)

Sdp.: 109°C (22 mbar)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.28-7.16 (m, 3H, arom. H); 3.72 (d, 2H, $^2J=15.5$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
178.55

(p-Methoxybenzyl)dichlorphosphan 70



$\text{C}_8\text{H}_9\text{Cl}_2\text{OP}$ [223,04]

Die Reaktion sowie alle Aufarbeitungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Für die Darstellung des Grignard-Reagenzes wurden 7,0 g p-Methoxybenzylchlorid **65** (44,7 mmol), gelöst in 40 ml abs. Tetrahydrofuran, mit 1,09 g Magnesium-Spänen (44,7 mmol) umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Föns gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung noch 1 Stunde unter Rückfluss gekocht und anschließend auf 0°C abgekühlt. Die magnesiumorganische Verbindung wurde durch Zugabe von 4,03 g CdCl_2 (22 mmol,

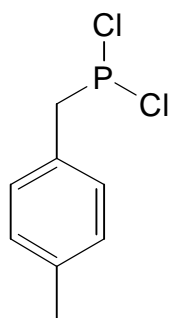
24h im Vakuum (10^{-1} mbar) bei 150°C über P_2O_5 getrocknet) ummetalliert. Nach 2h Rühren bei Raumtemperatur wurden die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abfiltriert. Die gelbliche Lösung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) während 30 min auf ein Gemisch aus 30 ml PCl_3 (343 mmol) und 50 ml abs. THF getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte bei dieser Temperatur noch weitere 2 Stunden. Der ausgefallene Niederschlag wurde wiederum über eine Schlenkfritte entfernt und der Filterkuchen zweimal mit je 20 ml abs. THF gewaschen. Das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl_3 wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Die Aufreinigung des weißen, festen Rückstandes mittels Hochvakuumdestillation gelang nicht. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte mittels der ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren. Für die folgenden Syntheseschritte wurde das Rohprodukt eingesetzt.

Ausbeute: 6,54 g (66%)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
6.83-6.66 (m, 4H, arom. H); 3.85 (s, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 3.73 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
167.92

(p-Methylbenzyl)dichlorphosphan 71



$\text{C}_8\text{H}_9\text{Cl}_2\text{P}$ [207,04]

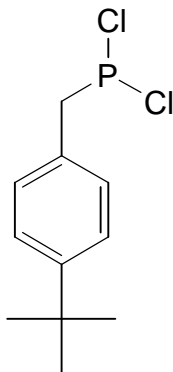
Alle Apparaturen und Kolben, die in dieser Reaktion eingesetzt wurden, wurden ausgeheizt und mit Argon geflutet. Zu 0,66 g Mg-Spänen (27 mmol) wurde innerhalb von 30 min portionsweise 5,0 g p-Methylbenzylbromid **66** (27 mmol) (gelöst in 50 ml abs. Ether) zugetropft. Die Reaktion wurde durch leichtes Erwärmen gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 1h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 0°C wurde zu der erhaltenen Grignard-Lösung 2,48 g CdCl₂ (9 mmol; 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) über P₂O₅ getrocknet) gegeben und 1h bei 0°C und anschließend 1h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde direkt innerhalb einer Stunde zu einer auf -78°C (Aceton/fl. N₂) abgekühlten Lösung aus 18,9 ml PCl₃ (216 mmol) und 50 ml abs. Ether getropft. Man lies innerhalb von 1h auf RT kommen und rührte noch eine weitere Stunde bei dieser Temperatur. Das ausgefallene Salz wurde wiederum über eine Schlenkfritte abgetrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 50 ml abs. Ether gewaschen. Der Ether sowie überschüssiges PCl₃ wurden im Membranpumpenvakuum abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Verbindung **71** wurde als klares zähflüssiges Öl erhalten.

Ausbeute: 4,18 g (74%)

Sdp.: 116°C (10⁻² mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.23-7.06 (m, 4H, arom. H); 3.78 (d, 2H, ²J=12.1 Hz, C₆H₅-CH₂-); 2.29 (s, 3H, -CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
182.11

(p-*t*-Butylbenzyl)dichlorphosphan 72**C₁₁H₁₅Cl₂P [249,12]**

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungen wurden unter Argonatmosphäre sowie in ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. 5,0 g p-(*t*-Butyl)benzylbromid **67** (22 mmol) wurden in 35 ml abs. Diethylether gelöst und auf 0,54 g Mg-Späne (22 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Heissluftföns gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Die erhaltene Grignard-Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 2,02 g CdCl₂ (11 mmol; 24h im Vakuum (10⁻¹ mbar) bei 150°C über P₂O₅ getrocknet) ummetalliert. Die Lösung wurde 2h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend die ausgefallenen Salze über eine Schlenkfritte abgetrennt. Die cadmiumorganische Verbindung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N₂) innerhalb von 60 min in eine Mischung aus 15,4 ml Phosphortrichlorid (176 mmol) und 50 ml abs. Ether getropft. Die ausgefallenen Salze wurden mittels einer Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit je 20 ml abs. Ether gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel wie auch überschüssiges PCl₃ abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

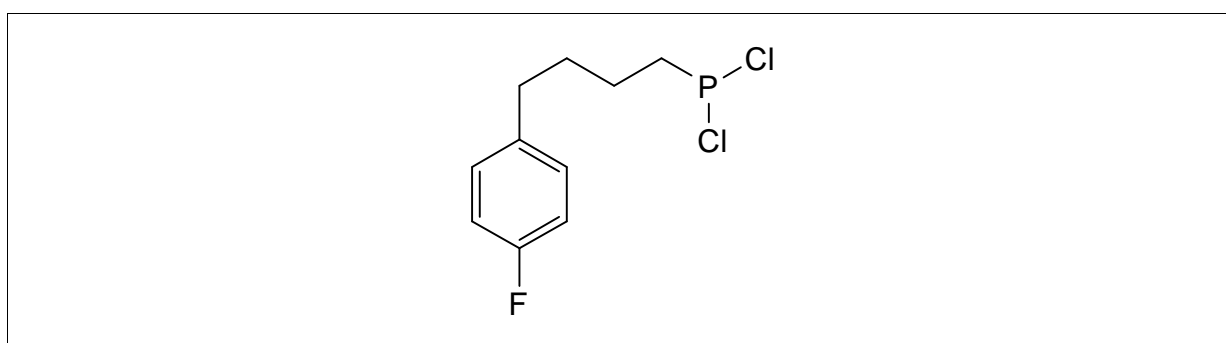
Ausbeute: 3,99 g (73%)

Sdp.: 122°C (10⁻⁵ mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.43-7.18 (m, 4H, arom. H); 3.72 (d, 2H, $^2J=14.9$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 1.36 (s, 9H, $-\text{CH}_3$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
180.07

(4-(4-Fluorphenyl)butyl)dichlorphosphan 73



$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{FP}$ [253,08]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungen wurden unter Argonatmosphäre sowie in ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. 5,0 g 4-(4-Fluorphenyl)butylbromid **17** (21,6 mmol) wurden in 40 ml abs. Diethylether gelöst und auf 525 mg Mg-Späne (21,6 mmol) getropft. Die Reaktion wurde durch Erwärmen mittels eines Heissluftföns gestartet. Nach vollständiger Zugabe wurde noch 1h unter Rückfluss gekocht. Die erhaltene Grignard-Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 1,98 g CdCl_2 (10,8 mmol; 24h im Vakuum (10^{-1} mbar) bei 150°C über P_2O_5 getrocknet) ummetalliert. Die Lösung wurde 2h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das ausgefallene Salz über eine Schlenkfritte abgetrennt. Die cadmiumorganische Verbindung wurde bei -78°C (Aceton/fl. N_2) innerhalb von 20 min in eine Mischung von 15 ml Phosphortrichlorid (170 mmol) und 50 ml abs. Ether getropft. Das ausgefallenen Cadmiumsalze wurden mittels einer Schlenkfritte abgetrennt, wobei der Filterkuchen zweimal mit je 10 ml abs. Ether gewaschen wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittel wie auch das überschüssige PCl_3 abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

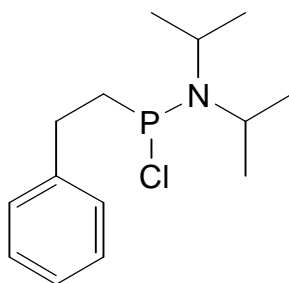
Ausbeute: 2,17 g (40%)

Sdp.: 145°C (10⁻¹ mbar)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.13-7.09 (m, 2H, arom. H); 7.01-6.93 (m, 2H, arom. H); 2.74 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.34 (m, 2H, -CH₂-P), 1.76 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₂-P).

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
194.99

2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan 75



C₁₄H₂₃ClNP [271,77]

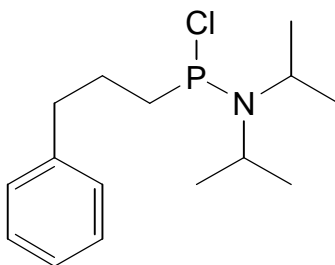
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Zu einer auf -40°C (Aceton/fl. N₂) abgekühlten Lösung aus 23,6 g 2-Phenylethylchlorphosphan **50** (114 mmol) und 100 ml abs. CH₂Cl₂ wurden innerhalb von 30 min 29,45 ml *N,N*-Diisopropylamin (209 mmol) zugetropft. Man liess auf RT erwärmen und rührte noch eine weitere Stunde. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit 50 ml abs. Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der ölige Rückstand fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 20,3 g (66%)

Sdp.: 124°C (10⁻³ mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.24-7.10 (m, 5H, arom. H); 3.62 (m, 2H, CH^iPr); 2.71 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$);
2.33-2.25 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.23-1.09 (m, 12H, -CH_3)
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
139.37

3-Phenylpropyl(diisopropylamin)chlorphosphan 76



$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{ClNP}$ [285,79]

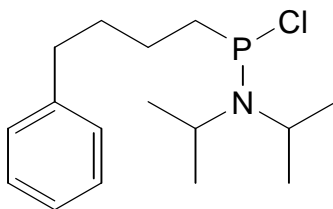
Die Reaktion wie auch die folgenden Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Zu einer Lösung aus 32,75 g 3-Phenylpropyldichlorphosphan **51** (148 mmol) und 150 ml abs. Dichlormethan wurde bei -35°C innerhalb einer Stunde 40,5 ml *N,N*-Diisopropylamin (287 mmol) zugetropft. Nach dem langsamen Erwärmen (1h) auf Raumtemperatur wurde noch eine Stunde gerührt. Der ausgefallene Niederschlag (Diisopropylammoniumchlorid) wurde über eine Schlenkfritte abfiltriert, der Filterkuchen zweimal mit 50 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel bei Normaldruck abdestilliert. Nach Hochvakuumdestillation wurde eine klare, viskose, sehr unangenehm riechende Flüssigkeit erhalten.

Ausbeute: 35,6 g (84%)

Sdp.: 145°C (10^{-3} mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.27-7.09 (m, 5H, arom. H); 3.40 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$); 2.66 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$);
2.20 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.81-1.64 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.19-1.04 (m, 12H, -
 CH_3)
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
140.55

4-Phenylbutyl(diisopropylamin)chlorphosphan 77



$\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{ClNP}$ [299,82]

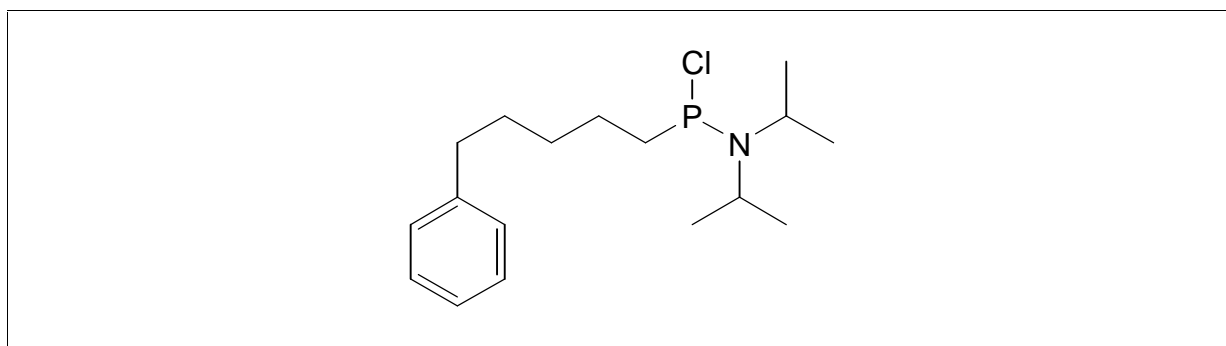
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 6,74 g 4-Phenylbutyldichlorphosphan **52** (29 mmol) wurden in 30 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/fl. N_2) wurde innerhalb von 1 Stunde mit 7,0 ml *N,N*-Diisopropylamin (50 mmol) versetzt. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 20 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 6,62 g (77%)

Sdp.: 140°C (10^{-5} mbar)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.31 (m, 2H, arom. H); 7.20 (m, 3H, arom. H); 3.43 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$); 2.78 (t, 2H, $^3J=7.5$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 2.15 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.73 (m, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.30-1.15 (m, 12H, -CH_3)
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
141.90

5-Phenylpentyl(diisopropylamin)chlorphosphan 78



$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{ClNP}$ [313,85]

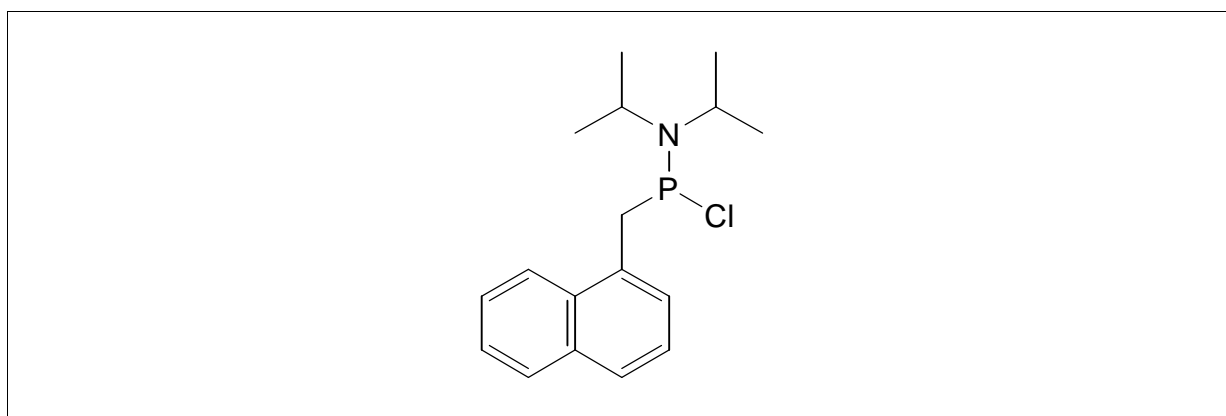
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Zu einer auf -40°C (Aceton/fl. N_2) abgekühlten Lösung aus 8,9 g 5-Phenylpentyldichlorphosphan **53** (36 mmol) und 40 ml abs. CH_2Cl_2 wurden innerhalb von 45 min 10,0 ml *N,N*-Diisopropylamin (71 mmol) zugetropft. Man lies auf RT kommen und rührte noch eine weitere Stunde nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit 20 ml abs. Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der ölige Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert. Bei der Destillation kam es zu Ausbeuteverlusten, da das sehr viskose Öl **78** sich bereits bei 160°C zu zersetzen begann.

Ausbeute: 4,2 g (38%)

Sdp.: 155°C (10^{-5} mbar)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.23-7.10 (m, 5H, arom. H); 3.41 (m, 2H, CH^iPr); 2.55 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$);
2.01 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.66 (m, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.41 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.30-1.08 (m, 12H, -CH_3)
 ^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
139.13

[(Naphth-1-yl)methyl](diisopropylamin)chlorphosphan 79



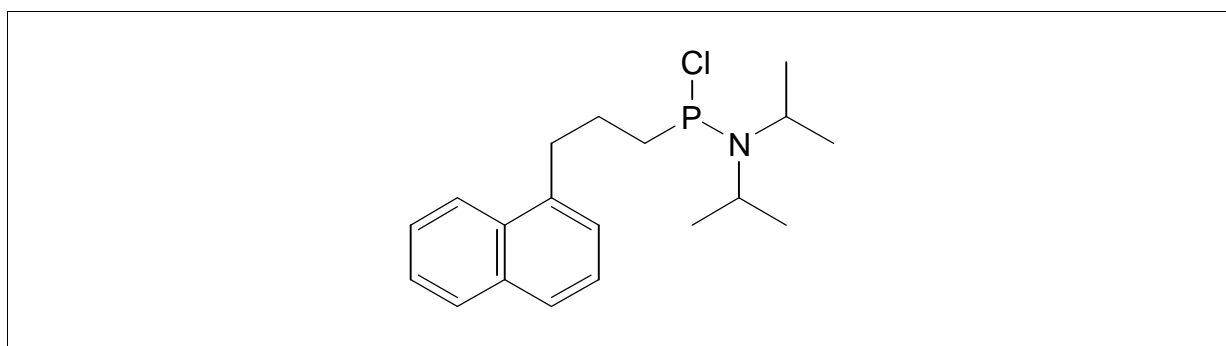
$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{ClNP}$ [307,80]

Die Reaktion wie auch die folgenden Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Zu einer Lösung aus 3,4 g [(Naphth-1-yl)methyl]dichlorphosphan **57** (14 mmol) und 15 ml abs. Dichlormethan wurde bei -35°C innerhalb von 30 min 3,7 ml *N,N*-Diisopropylamin (26 mmol) gegeben. Nach dem langsamen Erwärmen (1h) auf Raumtemperatur wurde noch eine Stunde gerührt. Der ausgefallene Niederschlag (Diisopropylammoniumchlorid) wurde über eine Schlenkfritte abfiltriert, der Filterkuchen noch zweimal mit 10 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel bei Normaldruck abdestilliert. Der erhaltene weiße Feststoff konnte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde daher über die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt.

Ausbeute: 2,5 g (56%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.02 (m, 1H, arom. H); 7.75 (m, 1H, arom. H); 7.63 (m, 1H, arom. H); 7.49-7.30 (m, 4H, arom. H); 3.84 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 3.29 (m, 2H, CH-Pr); 1.05 (m, 12H, -CH_3)
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
141.23

[3-(Naphth-1-yl)propyl](diisopropylamin)chlorphosphan 80



$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{ClNP}$ [335,85]

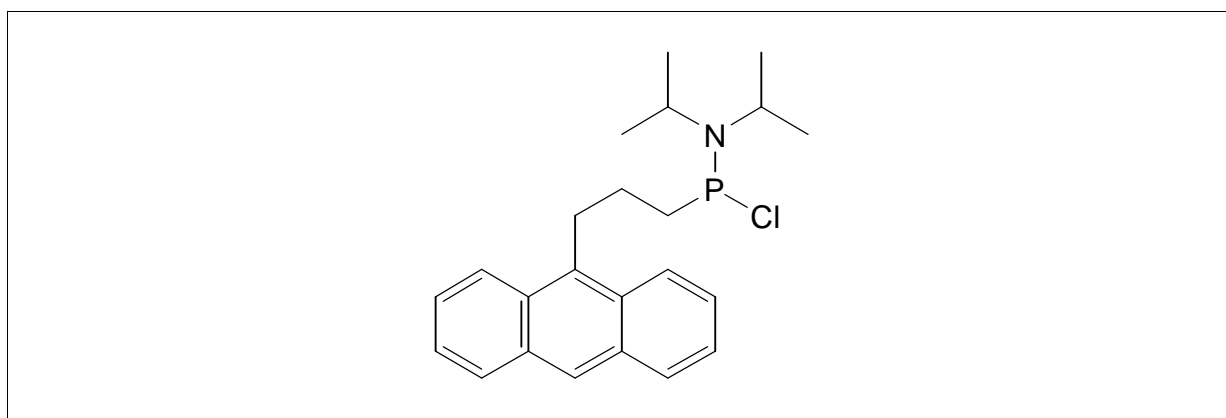
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 3,0 g [3-(Naphth-1-yl)propyl]dichlorphosphan **58** (11 mmol) wurden in 10 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/ N_2 fl.) innerhalb von einer Stunde mit 3,0 ml *N,N*-Diisopropylamin (21 mmol) versetzt. Man liess das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argonüberdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 10 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das nach Evaporation des Lösungsmittels erhaltene weiße, hoch viskose Öl **80** konnte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde deswegen über die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt.

Ausbeute: 2,61 g (70%)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.00 (m, 1H, arom. H); 7.80 (m, 1H, arom. H); 7.66 (m, 1H, arom. H); 7.46-7.26 (m, 4H, arom. H); 3.34 (m, 2H, $\text{CH}^i\text{-Pr}$); 3.04 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 1.75 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-P}$); 1.48 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.31 (m, 12H, $-\text{CH}_3$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
140.10

[3-(Anthracen-9-yl)propyl](diisopropylamin)chlorphosphan **81**



$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClNP}$ [385,91]

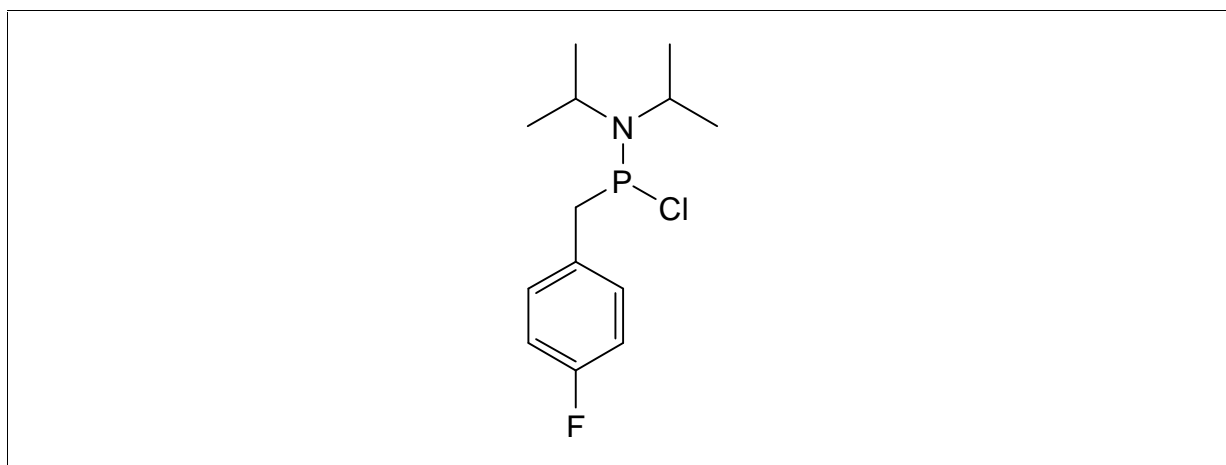
Die Reaktion wie auch die folgenden Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Zu einer Lösung aus 2,28 g [3-(Anthracen-9-yl)propyl]dichlorphosphan **62** (7,1 mmol) und 10 ml abs. Dichlormethan wurden bei -35°C innerhalb von 30 min 1,9 ml *N,N*-Diisopropylamin (13,4 mmol) zugetropft. Nach dem langsamen Erwärmen (1h) auf Raumtemperatur wurde noch eine Stunde gerührt. Der ausgefallene Niederschlag (Diisopropylammoniumchlorid) wurde über eine Schlenkfritte abfiltriert, der Filterkuchen zweimal mit 5 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen und das Lösungsmittel bei Normaldruck abdestilliert. Der erhaltene gelbe Feststoff **81** konnte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde daher über die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt.

Ausbeute: 2,03 g (74%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.31-8.20 (m, 3H, arom. H); 8.03 (m, 2H, arom. H); 7.56-7.41 (m, 4H, arom. H); 3.58 (m, 2H, CH-Pr); 3.42 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 2.25 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.93 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.49 (m, 12H, -CH_3)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
140.28

(4-Fluorbenzyl)(diisopropylamin)chlorphosphan 82



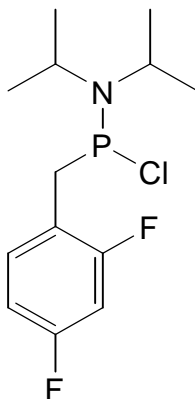
$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{ClFNP}$ [275,73]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 10,0 g (4-Fluorbenzyl)dichlorphosphan **68** (47,4 mmol) wurden in 80 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/fl. N_2) wurden innerhalb von 1,5 Stunden 13,4 ml *N,N*-Diisopropylamin (94,8 mmol) zugetropft. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur kommen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert und der weiße Filterkuchen zweimal mit 30 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 8,73 g (67%)

Sdp.: 118°C (10⁻¹ mbar)
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.19 (m, 2H, arom. H); 6.98 (m, 2H, arom. H); 3.43 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-, CH-
iPr); 1.26 (m, 12H, -CH₃)
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
133.77

(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)chlorphosphan 83



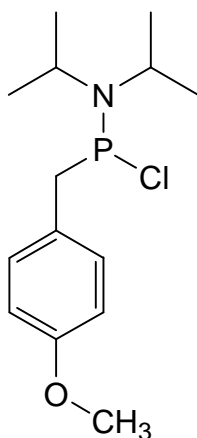
C₁₃H₁₉ClF₂NP [293,72]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 5,0 g (2,4-Difluorbenzyl)dichlorphosphan **69** (22 mmol) wurden in 30 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/fl. N₂) innerhalb von einer Stunde mit 6,08 ml *N,N*-Diisopropylamin (44 mmol) versetzt. Nach vollständiger Zugabe lies man das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argonüberdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 10 ml abs. CH₂Cl₂ gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 4,73 g (74%)

Sdp.: 88°C (10⁻¹ mbar)
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.21 (m, 1H, arom. H); 6.84 (m, 2H, arom. H); 3.52 (m, 2H, C₆H₅-CH₂-);
3.41 (m, 2H, CH-ⁱPr); 1.25 (m, 12H, -CH₃)
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
133.19

[p-(Methoxy)benzyl](diisopropylamin)chlorphosphan **84**



C₁₄H₂₃ClNOP [287,77]

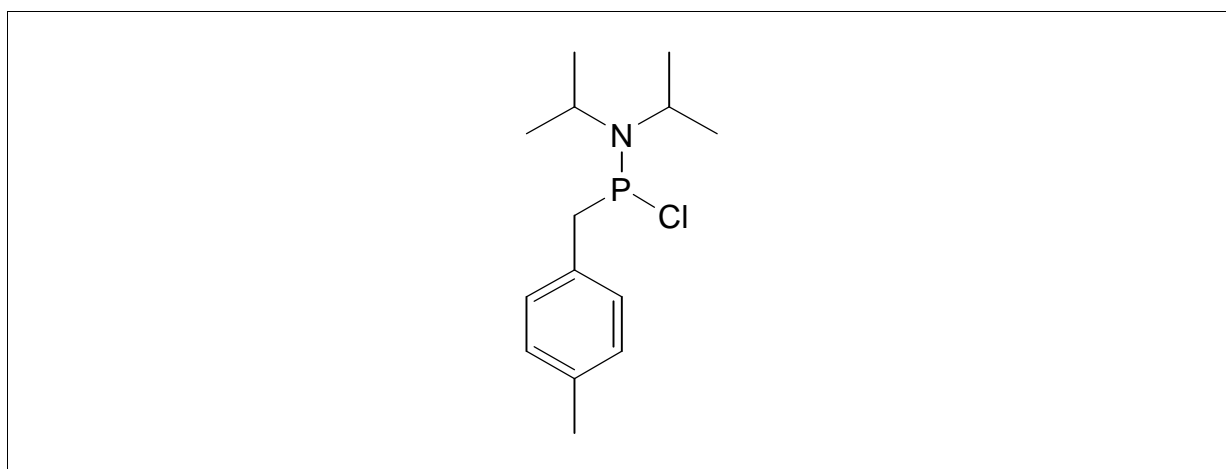
Die Reaktion wie auch die folgenden Aufreinigungsschritte wurden in ausgeheizten und mit Argon gefluteten Apparaturen durchgeführt. Zu einer Lösung aus 8,54 g (p-Methoxybenzyl)dichlorphosphan **70** (38,3 mmol) und 50 ml abs. Dichlormethan wurde bei -35°C innerhalb von 30 min 10,6 ml *N,N*-Diisopropylamin (76,6 mmol) gegeben. Nach dem langsamen Erwärmen (1h) auf Raumtemperatur wurde noch eine Stunde gerührt. Der ausgefallene Niederschlag (Diisopropylammoniumchlorid) wurde über eine Schlenkfritte abfiltriert, der Filterkuchen noch zweimal mit 20 ml abs. CH₂Cl₂ gewaschen und das Lösungsmittel bei Normaldruck abdestilliert. Der erhaltene weiße Feststoff **84** konnte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde aus diesem Grund über die ¹H- und ³¹P-NMR-Spektren bestimmt.

Ausbeute: 7,65 g (70%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
6.87-6.73 (m, 4H, arom. H); 3.69 (s, 3H, O- CH_3); 3.61 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$);
3.43 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$); 1.71-1.01 (m, 12H, $-\text{CH}_3\text{-}^i\text{Pr}$).

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
135.48

[(p-Methyl)benzyl](diisopropylamin)chlorphosphan 85

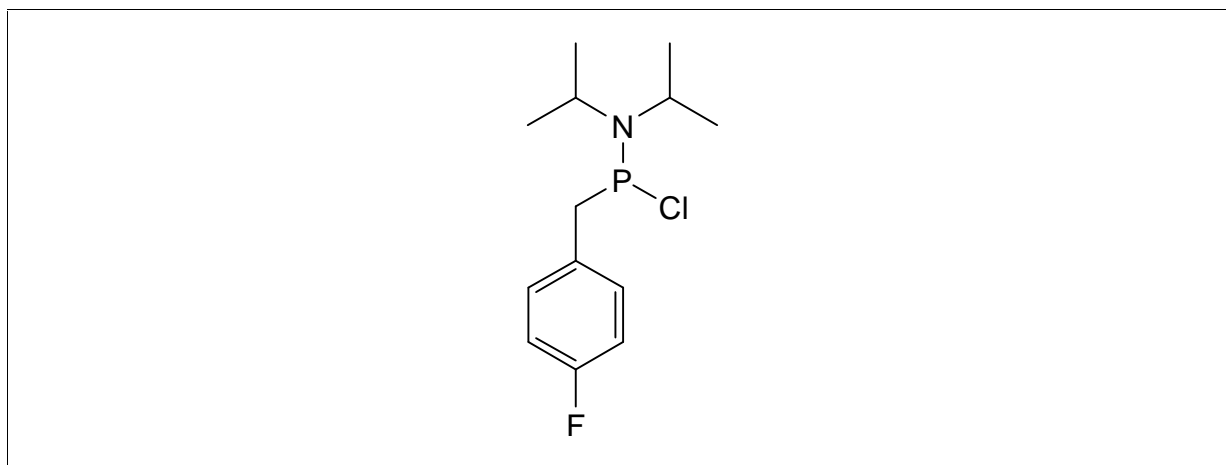


$\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{ClNP}$ [271,77]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 4,18 g (p-Methylbenzyl)dichlorphosphan **71** (20,2 mmol) wurden in 40 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/fl. N_2) wurde innerhalb von einer Stunde 5,6 ml *N,N*-Diisopropylamin (40,2 mmol) zugetropft. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur kommen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 10 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 3,7 g (67%)
Sdp.: 125°C (10⁻² mbar)
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7.15-7.03 (m, 4H, arom. H); 3.56 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 3.41 (m, 2H, CH-ⁱPr);
2,32 (s, 3H, -CH₃); 1.21-1.05 (m, 12H, -CH₃-ⁱPr)
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
135.91

[p-(*t*-Butyl)benzyl](diisopropylamin)chlorphosphan 86



C₁₇H₂₉ClNP [313,85]

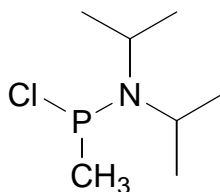
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Eine auf -40°C (Aceton/fl. N₂) abgekühlte Lösung aus 3,98 g [p-(*t*-Butyl)benzyl]dichlorphosphan **72** (16 mmol) und 30 ml abs. CH₂Cl₂ wurde innerhalb von 45 min mit 4,52 ml *N,N*-Diisopropylamin (32 mmol) versetzt. Nach vollständiger Zugabe lies man auf RT erwärmen und rührte noch eine weitere Stunde. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt und der Filterkuchen zweimal mit 20 ml abs. Dichlormethan gewaschen. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und der ölige Rückstand fraktioniert im Hochvakuum destilliert.

Ausbeute: 3,76 g (75%)

Sdp.: 130°C (10^{-5} mbar)
 $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.35-7.13 (m, 4H, arom. H); 3.46 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$); 3.39 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$);
2.32 (s, 3H, -CH_3); 1.30 (m, 12H, $\text{-CH}_3\text{-}^i\text{Pr}$; 9H, $\text{-CH}_3\text{-}^t\text{Bu}$)
 $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
136.31

Methyl(diisopropylamin)chlorphosphan 87

Literatur: Löschner, 1988



$\text{C}_7\text{H}_{17}\text{ClNP}$ [181,64]

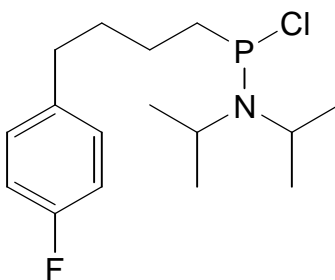
Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 5,0 g Methyldichlorphosphan (27,5 mmol) wurden in 20 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Bei einer Temperatur von -30°C (Aceton/fl. N_2) wurde innerhalb von 30 min 7,7 ml *N,N*-Diisopropylamin (55 mmol) zugetropft. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur kommen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 10 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 4,73 g (61%)

Sdp.: 70°C (10^{-1} mbar)
 $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
3.36 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$); 1.76 (s, 3H, -CH_3); 1.32 (m, 12H, -CH_3)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
137.56

[4-(4-Fluorphenyl)butyl](diisopropylamin)chlorphosphan 88



$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{ClFNP}$ [317,81]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. 2,0 g [4-(4-Fluorphenyl)butyl]dichlorphosphan **73** (7,9 mmol) wurden in 15 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Bei einer Temperatur von -40°C (Aceton/fl. N_2) wurde innerhalb von einer Stunde 2,2 ml *N,N*-Diisopropylamin (15,8 mmol) zugetropft. Man lies das Gemisch auf Raumtemperatur kommen und rührte 1h nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde mittels einer Schlenkfritte unter Argon-Überdruck abfiltriert und der Filterkuchen zweimal mit 7 ml abs. CH_2Cl_2 gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Normaldruck abdestilliert und der Rückstand im Hochvakuum fraktioniert destilliert.

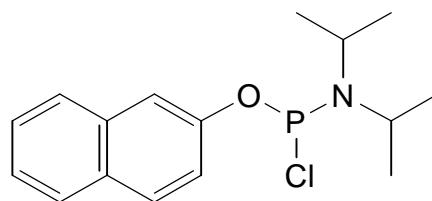
Ausbeute: 1,32 g (53%)

Sdp.: 130°C (10^{-5} mbar)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.11 (m, 2H, arom. H); 6.96 (m, 2H, arom. H); 3.41 (m, 2H, $\text{CH-}^i\text{Pr}$); 2.61 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 2.09 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.71 (m, 4H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.28-1.17 (m, 12H, -CH_3)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
141.63

(2-Naphthoxy)(diisopropylamin)chlorphosphan 89



$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClNOP}$ [309,77]

Die Reaktion wie auch die Aufarbeitungsschritte wurden unter Argonatmosphäre durchgeführt. Eine auf -25°C (Aceton/fl. N_2) abgekühlte Lösung aus 4,19 (2-Naphtoxydichlorphosphan **60** (17 mmol) und 10 ml abs. CH_2Cl_2 wurden innerhalb von 45 min mit 4,1 ml *N,N*-Diisopropylamin (29 mmol) versetzt. Nach vollständiger Zugabe lies man auf RT erwärmen und rührte noch eine weitere Stunde nach. Das ausgefallene Diisopropylammoniumchlorid wurde über eine Schlenkfritte abgetrennt, der Filterkuchen zweimal mit 5 ml abs. Dichlormethan gewaschen und das Lösungsmittel abdestilliert. Der gelbe ölige Rückstand konnte nicht weiter aufgereinigt werden. Die Ausbeute wurde daher über die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren bestimmt.

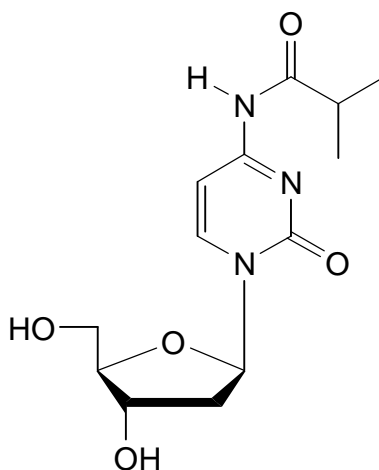
Ausbeute: 4,2 g (79%)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7.73-7.16 (m, 7H, arom. H); 3.94-3.83 (m, 2H, CH^iPr); 1.29-1.09 (m, 12H, $-\text{CH}_3$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
170.56

N*⁴-Isobutyryl-2'-desoxycytidin **90*

Literatur: Ti, 1982



C₁₃H₁₉N₃O₅ [297,31]

13,0 g getrocknetes 2'-Desoxycytidin-Hydrochlorid (49 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 300 ml abs. Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 31 ml Trimethylchlorsilan (250 mmol) getropft und 45 min gerührt. Man lies auf Raumtemperatur kommen und versetzte die Lösung mit 41 ml Isobuttersäureanhydrid (260 mmol). Nach dreistündigem Rühren wurde erneut auf 0°C gekühlt und mit 50 ml Wasser versetzt. Nach 5 min wurde bei RT 50 ml 32%ige wässrige NH₃-Lösung zugegeben und weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert und die weiße Suspension in einem Gemisch aus CH₂Cl₂/MeOH (9:1) aufgenommen und an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Das aminogeschützte Cytidin **90** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 13,51 g (92%)

DC: R_f = 0,20 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

10.84 (s, 1H, N-H); 8.32 (d, 1H, ³J=7.5 Hz, H-6); 7.23 (d, 1H, ³J=7.5 Hz, H-5); 6.10 (t, 1H, ³J=6.3 Hz, H1'); 5.26 (d, 1H, ³J=3.5 Hz, OH-3'); 5.05 (b,

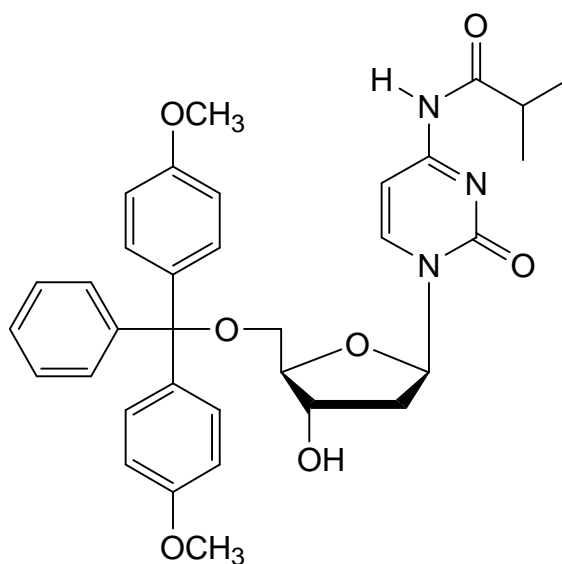
¹H, OH-5'); 4.20 (m, 1H, H3'); 3.85 (m, 1H, H4'); 3.59 (m, 2H, H5'); 2.76-2.65 (m, 1H, C-H ⁱBu); 2.29-2.23 (m, 1H, H2_α'); 2.08-1.95 (m, 1H, H2_β'); 1.05 (m, 6H, -CH₃ ⁱBu)

ESI-MS(-): berechnet: 296.3 m/z [M-H]⁻

gefunden: 296.3 m/z [M-H]⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91**

Literatur: Ti, 1982; Schaller, 1963



C₃₄H₃₇N₃O₇ [599,67]

2,55 g *N*⁴-Isobutyryl-2'-desoxycytidin **90** (8,6 mmol) wurden in 30 ml abs. Pyridin gelöst und unter Argonatmosphäre mit 2,95 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (11 mmol) versetzt. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, der Rückstand in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung (100 ml) sowie mit Wasser (100 ml) gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Die Verbindung **91** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,96 g (78%)

DC: $R_f = 0,23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, (d_6) -DMSO)

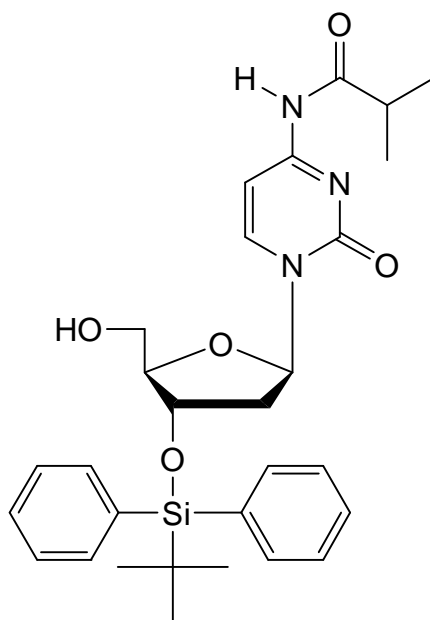
10.86 (s, 1H, N-H); 8.14 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6); 7.40-7.23 (m, 9H, arom. H); 7.08 (d, 1H, $^3J=7.4$ Hz, H-5); 6.89 (m, 4H, arom. H); 6.10 (t, 1H, $^3J=5.7$ Hz, H1'); 5.36 (d, 1H, $^3J=4.7$ Hz, OH-3'); 4.35-4.26 (m, 1H, H3'); 3.95 (m, 1H, H4'); 3.74 (s, 6H, O- CH_3); 3.25 (m, 2H, H5'); 2.76-2.64 (m, 1H, C-H ^iBu); 2.39-2.28 (m, 1H, H2 $_{\alpha}'$); 2.17-2.07 (m, 1H, H2 $_{\beta}'$); 1.06 (m, 6H, - CH_3 ^iBu)

ESI-MS(-): berechnet: 598.6 m/z $[\text{M-H}]^-$

gefunden: 598.4 m/z $[\text{M-H}]^-$

N*⁴-Isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxycytidin **92*

Literatur: Perbost, 1995; Ogilvie, 1973



$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}$ [535,71]

4,0 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (13,5 mmol) wurden in 60 ml abs. Pyridin gelöst und mit 2,11 g Imidazol (30 mmol) sowie mit 5,33 ml *tert*-

Butyldiphenylsilylchlorid (20 mmol) versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugaben von 15 ml Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel abdestilliert. Pyridinreste wurden durch dreimaliges Coevaporieren mit Toluol (30 ml) entfernt. Der trockene Rückstand wurde in 50 ml 80%iger Essigsäure aufgenommen und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Essigsäure wurde abgezogen und der Rückstand in 150 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Es wurde mit 5%iger NaHCO₃-Lösung sowie mit Wasser neutral gewaschen und die wässrigen Phasen mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Essigester/*n*-Hexan 1:1). Das Produkt **92** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,72 g (76%)

DC: R_f = 0,20 (Essigester/*n*-Hexan 7:3)

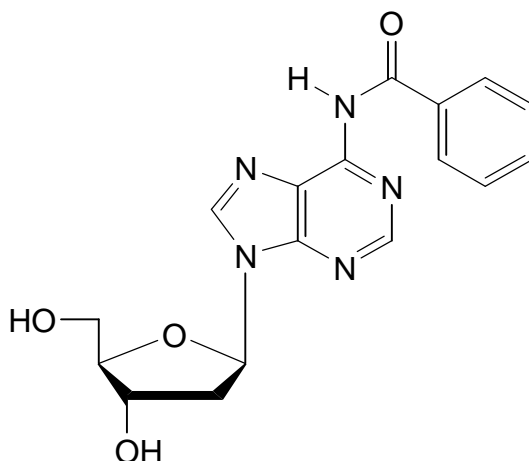
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
8.42 (s, 1H, N-H); 8.04 (d, 1H, ³J=7.5 Hz, H-6); 7.60-7.53 (m, 4H, arom. H); 7.38-7.29 (m, 7H, H-5, arom. H); 6.16 (t, 1H, ³J=6.3 Hz, H1'); 4.36 (m, 1H, H3'); 3.95 (m, 1H, H4'); 3.57 (m, 1H, H5_α'); 3.15 (m, 1H, H5_β'); 2.60-2.45 (m, 2H, C-H ⁱBu, H2_α'); 2.23 (b, 1H, OH-5'); 2.18-2.09 (m, 1H, H2_β'); 1.13 (d, 6H, -CH₃ ⁱBu); 1.00 (s, 9H, -CH₃ ^tBu).

ESI-MS(-): berechnet: 534.7 m/z [M-H]⁻

gefunden: 534.4 m/z [M-H]⁻

N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **93*

Literatur: Ti, 1982; Schaller, 1963



C₁₇H₁₇N₅O₄ [355,35]

4,0 g 2'-Desoxyadenosin (15,9 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 130 ml abs. Pyridin suspendiert und bei 0°C mit 10 ml Trimethylchlorsilan (79 mmol) versetzt. Nach 40-minütigem Rühren wurden 9,3 ml Benzoylchlorid (80 mmol) zugegeben und 2,5h bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Suspension wurde auf 0°C gekühlt und mit 40 ml Wasser versetzt, wobei sich der Niederschlag auflöste. Nach 5 min wurden bei RT 40 ml 32%ige NH₃-Lösung zugegeben und weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser aufgenommen. Es wurde zweimal mit 50 ml warmem Essigsäureethylester gewaschen und die vereinigten org. Phasen zweimal mit je 50 ml heißem Wasser reextrahiert. Aus den vereinigten wässrigen Phasen kristallisierte das Produkt **93** bei 4°C über Nacht aus. Der weiße Niederschlag wurde abgesaugt und im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 3,7 g (66%)

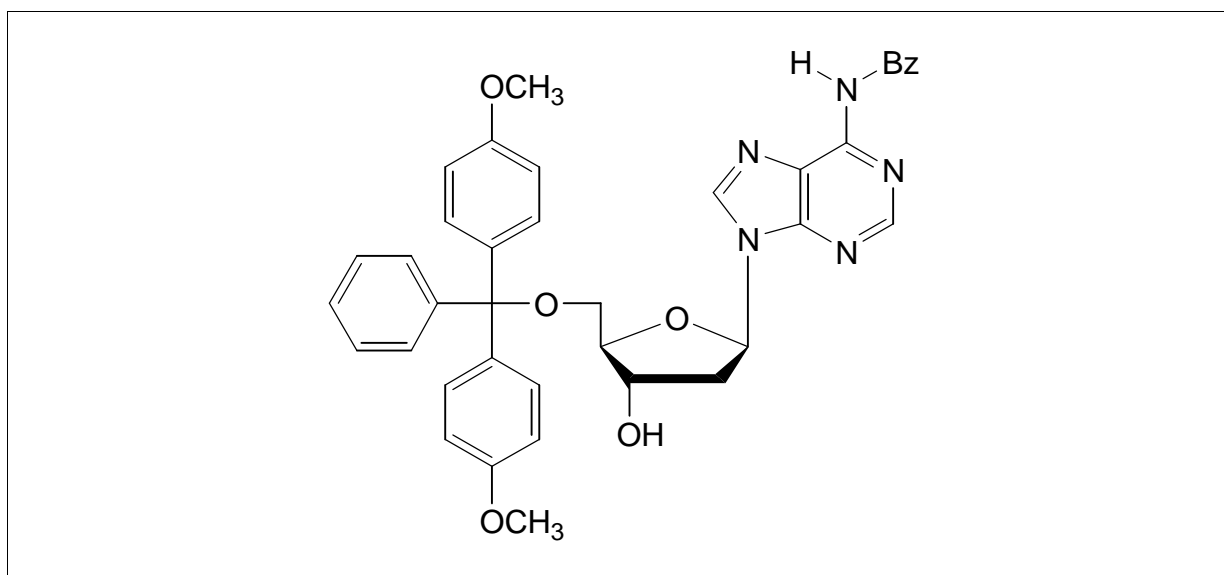
DC: R_f = 0,23 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, (d_6) -DMSO)
11.19 (b, 1H, N-H); 8.75 (s, 1H, H-8); 8.69 (s, 1H, H-2); 8.04 (m, 2H, arom. H); 7.68-7.49 (m, 3H, arom. H); 6.49 (t, 1H, $^3J=6.7$ Hz, H1'); 5.39 (b, 1H, OH-3'); 5.03 (b, 1H, OH-5'); 4.46 (m, 1H, H3'); 3.90 (m, 1H, H4'); 3.62-3.56 (m, 2H, H5'); 2.85-2.75 (m, 1H, H2 $_{\alpha}'$); 2.41-2.32 (m, 1H, H2 $_{\beta}'$)

ESI-MS(-): berechnet: 354.4 m/z [M-H]⁻
gefunden: 354.2 m/z [M-H]⁻

***N*⁶-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin 94**

Literatur: Ti, 1982; Schaller, 1963



C₃₈H₃₅N₅O₆ [657,71]

3,0 g *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **93** (8,5 mmol) wurden in 30 ml abs. Pyridin gelöst und unter Argonatmosphäre mit 3,8 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (11,2 mmol) versetzt. Nach 1,5 Stunden rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, der Rückstand in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung (50 ml) sowie mit Wasser (50 ml) gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 95:5). Die Verbindung **94** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,9 g (72%)

DC: $R_f = 0,38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

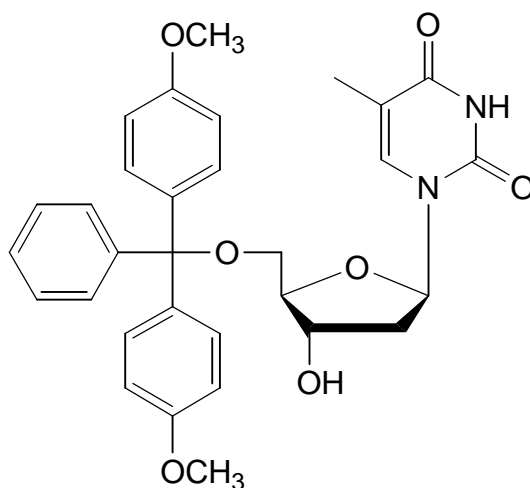
9.09 (b, 1H, N-H); 8.65 (s, 1H, H-8); 8.09 (s, 1H, H-2); 7.96 (m, 2H, arom. H); 7.56-7.09 (m, 12H, arom. H); 6.71 (m, 4H, arom. H); 6.41 (t, 1H, $^3J=6.4$ Hz, H1'); 5.21 (b, 1H, OH-3'); 4.67-4.62 (m, 1H, H3'); 4.10 (m, 1H, H4'); 3.69 (s, 6H, O- CH_3); 3.33 (m, 2H, H5'); 2.86-2.76 (m, 1H, H2 $_{\alpha}'$); 2.54-2.44 (m, 1H, H2 $_{\beta}'$)

ESI-MS(-): berechnet: 656.7 m/z $[\text{M-H}]^-$

gefunden: 656.4 m/z $[\text{M-H}]^-$

5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin 95

Literatur: Schaller, 1963



$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$ [544,60]

6,0 g getrocknetes Thymidin (25 mmol) wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und unter Argonatmosphäre mit 9,5 g 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (28 mmol) versetzt. Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, der Rückstand in 100 ml

Dichlormethan aufgenommen und mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung (50 ml) sowie mit Wasser (50 ml) gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2). Die Verbindung **95** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 12,6 g (93%)

DC: $R_f = 0,25$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

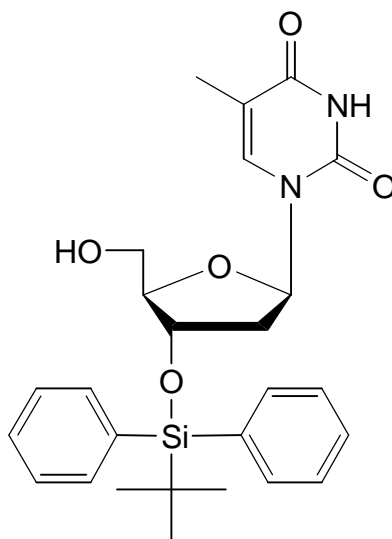
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, (d_6) -DMSO)
9.07 (b, 1H, N-H); 7.51 (s, 1H, H-6); 7.42-7.23 (m, 9H, arom. H); 6.90 (m, 4H, arom. H); 6.22 (t, 1H, $^3J=6.6$ Hz, H1'); 5.33 (d, 1H, $^3J=4.5$ Hz, OH-3'); 4.34 (m, 1H, H3'); 3.89 (m, 1H, H4'); 3.74 (s, 6H, O- CH_3); 3.25-3.15 (m, 2H, H5'); 2.31-2.11 (m, 2H, H2'); 1.46 (m, 3H, - CH_3)

ESI-MS(-): berechnet: 543.6 m/z $[\text{M-H}]^-$

gefunden: 543.3 m/z $[\text{M-H}]^-$

3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **96**

Literatur: Szabó, 1995; Hanessian, 1975; Ogilvie, 1973



$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ [480,63]

2,0 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (3,67 mmol) wurden in 30 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,68 g Imidazol (10 mmol) sowie mit 2,56 ml *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (10 mmol) versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugaben von 5 ml Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel abdestilliert. Pyridinreste wurden durch dreimaliges coevaporieren mit Toluol (20 ml) entfernt. Der trockene Rückstand wurde in 50 ml 80%iger Essigsäure aufgenommen und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Essigsäure wurde abgezogen und der Rückstand in 100 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Es wurde mit 5%iger NaHCO₃-Lösung sowie mit Wasser neutral gewaschen und die wässrigen Phasen mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 98:2). Das Produkt **96** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,53 g (86%)

DC: R_f = 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

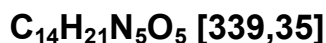
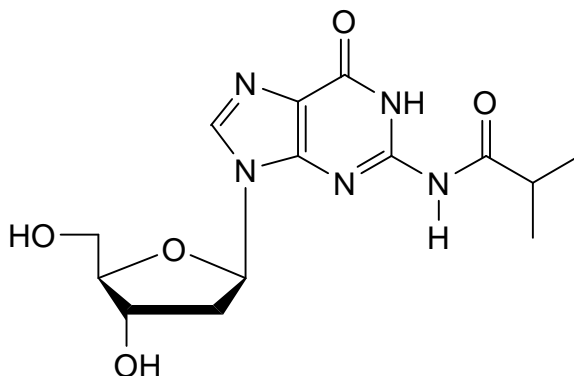
8.05 (b, 1H, N-H); 7.59-7.55 (m, 4H, arom. H); 7.37-7.31 (m, 6H, arom. H); 7.19 (s, 1H, H-6); 7.42-7.23 (m, 9H, arom. H); 6.90 (m, 4H, arom. H); 6.15 (t, 1H, ³J=6.2 Hz, H1'); 4.38 (m, 1H, H3'); 3.90 (m, 1H, H4'); 3.59-3.53 (m, 1H, H5_α'); 3.16 (m, 1H, H5_β'); 2.33-2.10 (m, 2H, H2'); 1.78 (m, 3H, -CH₃)

ESI-MS(-): berechnet: 479.6 m/z [M-H]⁻

gefunden: 479.5 m/z [M-H]⁻

N*²-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **97*

Literatur: Ti, 1982



4,0 g 2'-Desoxyguanosin (15 mmol) wurden unter Argonatmosphäre in 120 ml abs. Pyridin suspendiert und bei 0°C mit 10 ml Trimethylchlorsilan (79 mmol) versetzt. Nach 30 min Rühren wurden 13,5 ml Isobuttersäureanhydrid (92 mmol) zugegeben und 3h bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Suspension wurde auf 0°C gekühlt und mit 40 ml Wasser versetzt wobei sich der Niederschlag auflöste. Nach 5 min wurden bei RT 40 ml 32%ige NH₃-Lösung zugegeben und weitere 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde abgezogen und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser aufgenommen. Es wurde zweimal mit 50 ml warmem Essigsäureethylester gewaschen und die vereinigten org. Phasen zweimal mit je 50 ml heißem Wasser reextrahiert. Aus den vereinigten wässrigen Phasen kristallisierte das Produkt **97** bei 4°C über Nacht aus. Der weiße Niederschlag wurde abgesaugt und im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 3,85 g (76%)

DC: R_f = 0,13 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, (d₆)-DMSO)

12.05 (s, 1H, N-H); 11.57 (s, 1H, N-H); 8.23 (s, 1H, H-8); 6.20 (t, 1H, ³J=6.2 Hz, H1'); 5.30 (d, 1H, ³J=3.3 Hz, OH-3'); 4.95 (m, 1H, OH-5'); 4.36 (m, 1H, H3'); 3.83 (m, 1H, H4'); 3.59-3.47 (m, 2H, H5'); 2.81-2.70 (m, 1H,

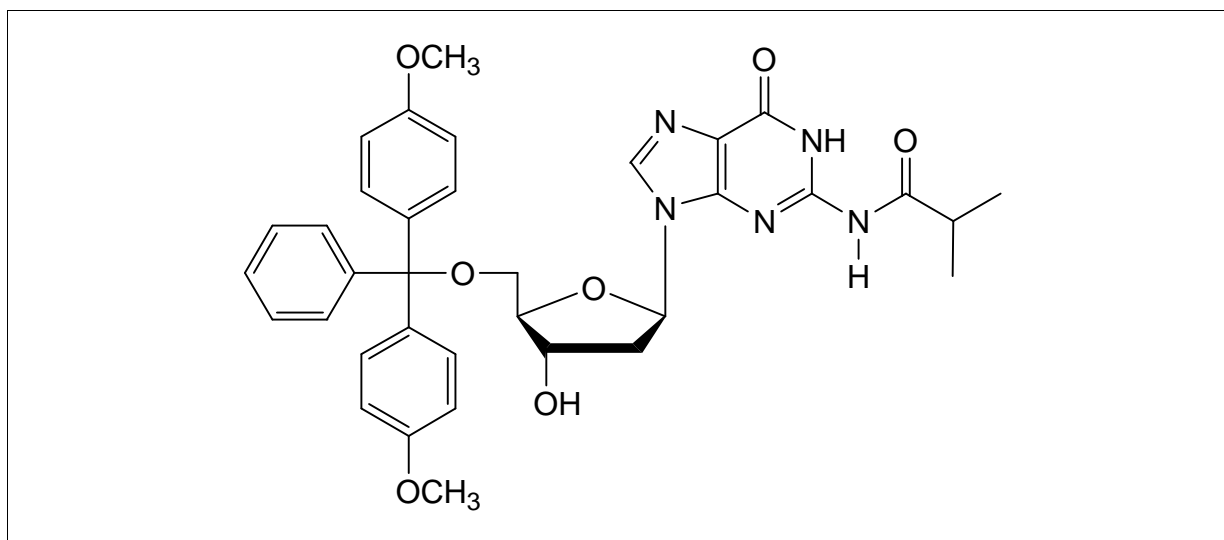
C-H ⁱBu); 2.60-2.49 (m, 1H, H2_α′); 2.31-2.22 (m, 1H, H2_β′); 1.11 (d, 6H, ³J=6.8 Hz, -CH₃ ⁱBu)

ESI-MS(-): berechnet: 368.3 m/z [M-H]⁻

gefunden: 366.3 m/z [M-H]⁻

5′-O-(4,4′-Dimethoxytrityl)-*N*²-isobutyryl-2′-desoxyguanosin **98**

Literatur: Gait, 1984



C₃₅H₃₉N₅O₇ [641,71]

3,5 g *N*²-Isobutyryl-2′-desoxyguanosin **97** (10,4 mmol) wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und unter Argonatmosphäre mit 3,45 g 4,4′-Dimethoxytritylchlorid (12,8 mmol) versetzt. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml Methanol abgebrochen. Die Lösungsmittel wurden abgezogen, der Rückstand in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung (100 ml) sowie mit Wasser (100 ml) gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 95:5). Die Verbindung **98** wurde als hellgelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 7,08 g (83%)

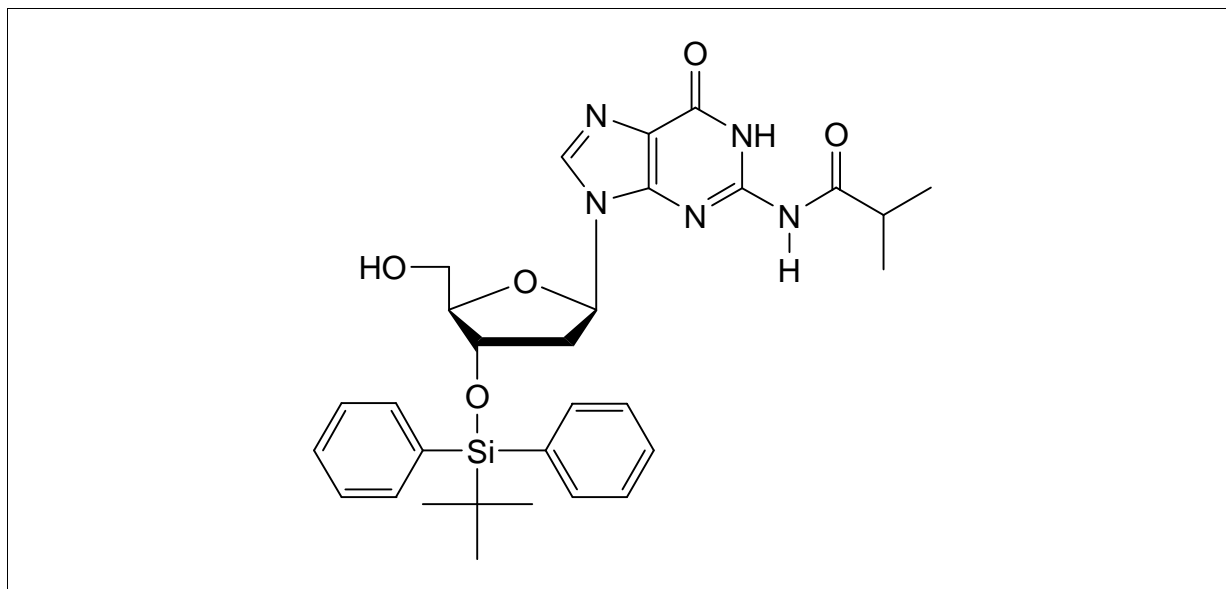
DC: R_f = 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, (d_6) -DMSO)
 12.09 (s, 1H, N-H); 11.66 (s, 1H, N-H); 8.11 (s, 1H, H-8); 7.33-7.16 (m, 9H, arom. H); 6.80 (m, 4H, arom. H); 6.26 (t, 1H, $^3J=6.2$ Hz, H1'); 5.35 (b, 1H, OH-3'); 4.45-4.34 (m, 1H, H3'); 4.00-3.93 (m, 1H, H4'); 3.71 (s, 6H, O-CH₃); 3.24-3.08 (m, 2H, H5'); 2.82-2.58 (m, 2H, C-HⁱBu, H2 _{α} '); 2.39-2.29 (m, 1H, H2 _{β} '); 1.10 (d, 6H, -CH₃ⁱBu)
 ESI-MS(+): berechnet: 642,7 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 640,5 m/z [M+H]⁺

***N*²-Isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin**

99

Literatur: Perbost, 1995



C₃₀H₃₉N₅O₅Si [577,75]

7,0 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (10,8 mmol) wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,7 g Imidazol (23,7 mmol) sowie mit 5,3 ml *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (19,8 mmol) versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugaben von 10 ml Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel abdestilliert. Pyridinreste wurden durch dreimaliges Coevaporieren mit Toluol (30 ml) entfernt. Der trockene Rückstand wurde in 120 ml

80%iger Essigsäure aufgenommen und 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Essigsäure wurde abgezogen und der Rückstand in 250 ml CH_2Cl_2 aufgenommen. Es wurde mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung sowie mit Wasser neutral gewaschen und die wässrigen Phasen mit CH_2Cl_2 reextrahiert. Die vereinigten Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, abfiltriert, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2). Das Produkt **99** wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 5,05 g (80%)

DC: $R_f = 0,18$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

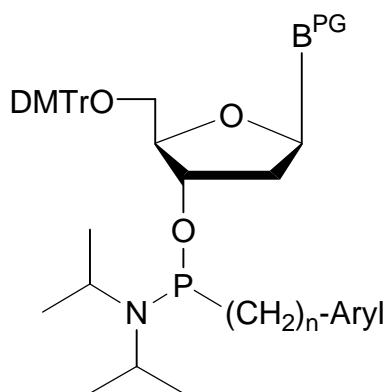
^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

11.93 (s, 1H, N-H); 8.11 (s, 1H, N-H); 7.63 (s, 1H, H-8); 7.59-7.55 (m, 4H, arom. H); 7.43-7.29 (m, 6H, arom. H); 6.15 (dd, 1H, $^3J=5.5$ Hz, H1'); 4.96 (b, 1H, OH-5'); 4.53 (m, 1H, H3'); 4.04 (m, 1H, H4'); 3.60 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '); 3.05 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '); 2.64-2.45 (m, 1H, C-H ^iBu , H2 $_{\alpha}$ '); 2.24-2.18 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '); 1.16 (m, 6H, $-\text{CH}_3$ ^iBu); 1.04 (s, 9H, $-\text{CH}_3$ ^iBu)

ESI-MS(-): berechnet: 576.7 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$

gefunden: 575.5 m/z $[\text{M}-\text{H}]^-$

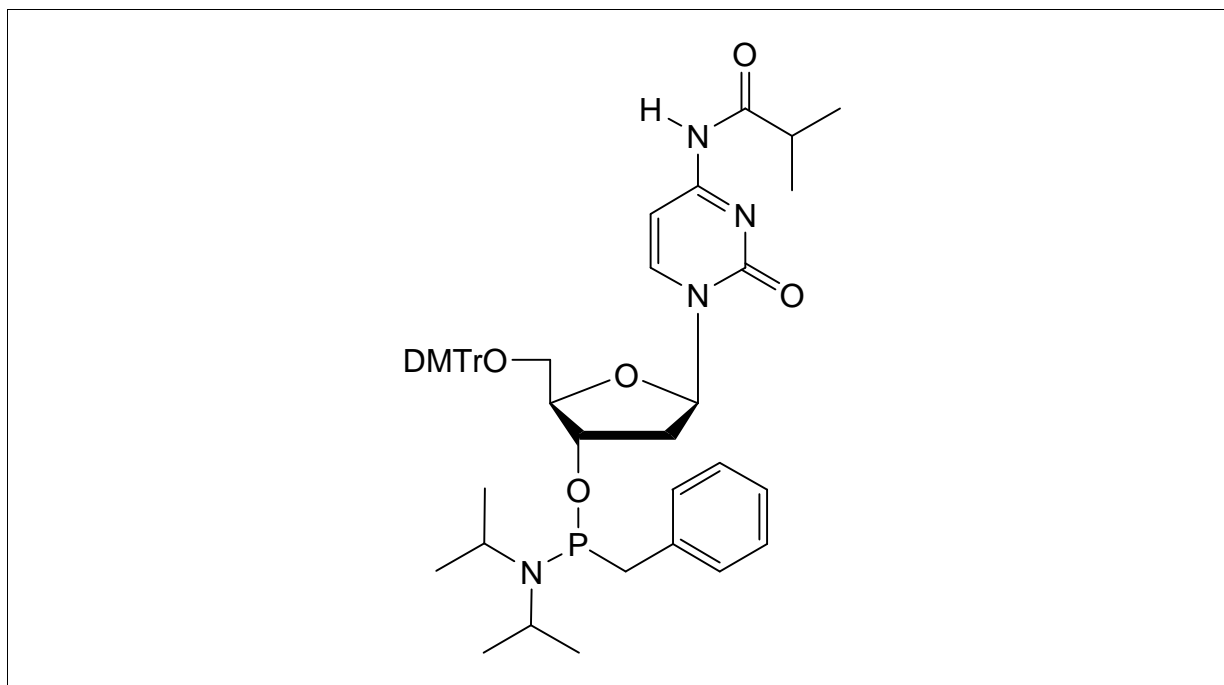
Allgemeine Synthesevorschrift für die modifizierten Phosphoramidite



1 äq. getrocknetes 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- und Basen- geschütztes Nucleosid **91**, **94**, **95** oder **98** wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Argonatmosphäre in abs. Dichlormethan gelöst und mit 4 äq. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 1,2–4 äq. modifizierter Phosphorylierer gegeben und bei Raumtemperatur 0,5 bis 4h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit der doppelten Menge an CH_2Cl_2 verdünnt, auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 5-10 ml 5%iger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Essigester reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel abdestilliert, wobei die Wasserbadtemperatur 45°C nicht überschreiten sollte. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: Essigester/*n*-Hexan/TEA). Die Chromatographie sollte nach spätestens 1h beendet sein (R_f -Wert sollte zwischen 0,3 und 0,7 liegen)! Die zwei Diastereoisomeren wurden jeweils im Verhältnis 1:1 als Schaum erhalten.

3'-O-[(Benzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 100

Literatur: Lehmann, 2001; Samstag, 1994; Samstag, 1992



C₄₇H₅₇N₄O₇P [820,95]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,5 g Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **5** (1,94 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 399 mg (58%)

DC: R_f = 0,38 und 0,50 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
 9.40 (b, 2H, N-H); 8.19, 8.06 (2d, 2H, ³J=7.6 Hz, H-6); 7.35-7.07 (m, 30H, arom. H, H-5); 6.82 (m, 8H, arom. H); 6.21 (m, 2H, H1'); 4.48, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.19, 4.11 (2m, 2H, H4'); 3.80 (m, 12H, O-CH₃); 3.60-3.24 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.69 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.50 (m, 2H, H2_α'); 2.21 (m, 1H, H2_β'); 1.87 (m, 1H, H2_β'); 1.34-1.04 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

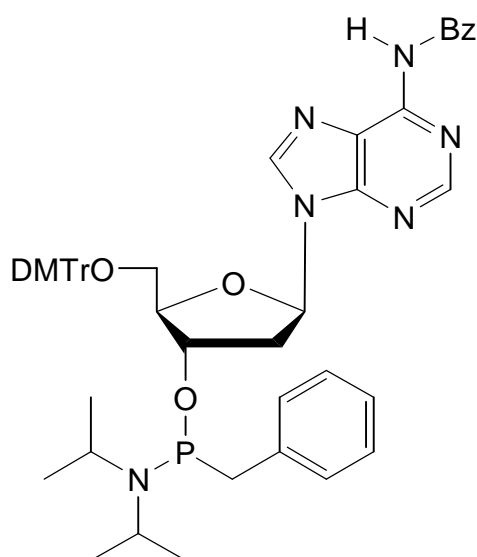
117.52, 116.05

ESI-MS(+): berechnet: 821.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 821.8 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(Benzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^6 -benzoyladenosen 101

Literatur: Lehmann, 2001; Samstag, 1994; Samstag, 1992



$\text{C}_{51}\text{H}_{55}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ [878,99]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^6 -benzoyl-2'-desoxyadenosin **94** (0,76 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 15 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,6 g Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **5** (2,44 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 527 mg (79%)

DC: R_f = 0,66 und 0,74 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

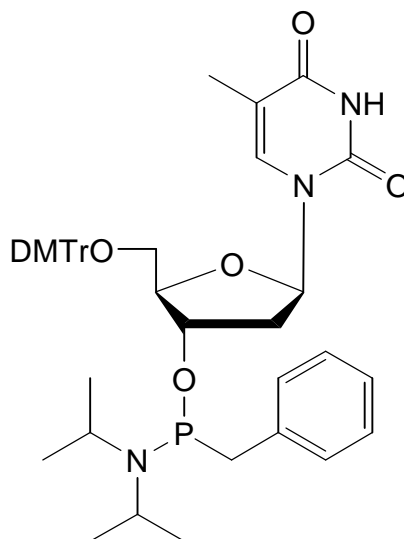
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.99 (2s, 2H, N-H); 8.76 (2s, 2H, H-8); 8.06 (m, 2H, H-2); 7.56-7.20 (m, 38H, arom. H); 6.80 (m, 8H, arom. H); 6.50, 6.09 (2t, 2H, $^3J=6.4$ Hz, H1'); 4.60, 4.52 (2m, 2H, H3'); 4.28, 3.93 (2m, 2H, H4'); 3.80 (2s, 12H, O-CH₃); 3.64 (m, 4H, H5'); 3.40-3.13 (m, 8H, C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.62 (m, 2H, H2 _{α}); 1.97 (m, 2H, H2 _{β}); 1.25-1.01 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
127.14, 126.34

ESI-MS(+): berechnet: 880.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 879.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(Benzyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin 102

Literatur: Lehmann, 2001; Samstag, 1994; Samstag, 1992



C₄₄H₅₂N₃O₇P [765,35]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (0,92 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 15 ml abs. CH₂Cl₂, 0,6 g Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **5** (3,13 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 412 mg (59%)

DC: R_f = 0,43 und 0,49 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

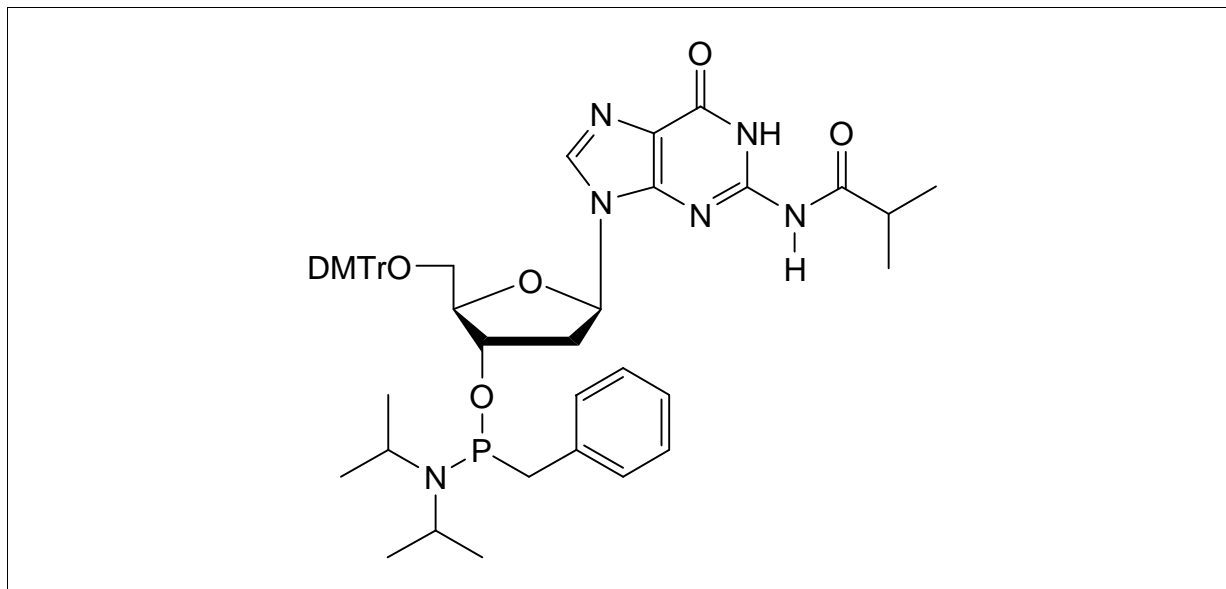
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
9.23 (b, 2H, N-H); 7.64, 7.55 (2s, 2H, H-6); 7.37-7.16 (m, 28H, arom. H); 6.80 (m, 8H, arom. H); 6.38, 6.30 (2m, 2H, H1'); 4.44 (m, 2H, H3'); 4.08 (m, 2H, H4'); 3.79 (m, 12H, O-CH₃); 3.55-3.14 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-HⁱPr); 2.36-2.12 (m, 4H, H2'); 2.07 (s, 6H, -CH₃(T)); 1.38-1.07 (m, 24H, -CH₃ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
129.14, 126.54

ESI-MS(+): berechnet: 766.3 m/z [M+H]⁺
gefunden: 766.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[Benzyl](diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*²-isobutyrylguanosin 103

Literatur: Lehmann, 2001; Samstag, 1994; Samstag, 1992



C₄₈H₅₉N₆O₇P [862,99]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (0,78 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,65 g Benzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **5** (2,52 mmol); Reaktionszeit: 2,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 278 mg (41%)

DC: R_f = 0,70 und 0,73 (Essigester/TEA 99:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

11.47 (b, 2H, N-H); 9.21 (b, 2H, N-H); 7.74 (m, 2H, H-8); 7.39-7.18 (m, 28H, arom. H); 6.76 (m, 8H, arom. H); 6.07 (m, 2H, H1'); 4.51 (m, 2H, H3'); 4.13, 3.99 (2m, 2H, H4'); 3.76 (m, 12H, O-CH₃); 3.62-3.19 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.79-2.54 (m, 4H, H2_α', C-H ⁱBu); 2.33 (m, 2H, H2_β'); 1.28-0.99 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

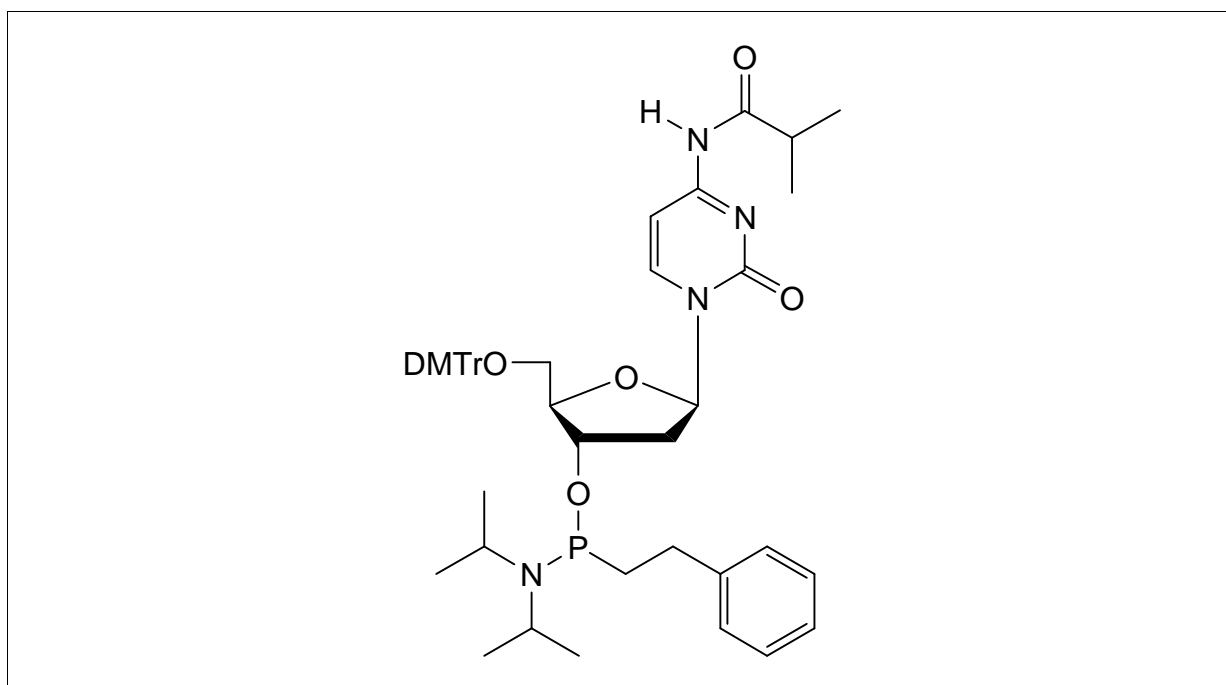
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

126.18, 115.23

ESI-MS(+): berechnet: 864.0 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 861.7 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

**3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-
O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 104**



$\text{C}_{48}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ [834,98]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

700 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (1,16 mmol), 0,9 ml DIPEA (5,0 mmol), 10 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,38 g 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75** (1,4 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 714 mg (73%)

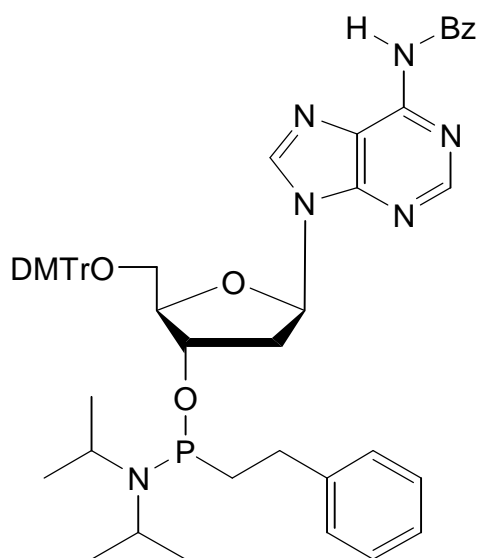
DC: R_f = 0,23 und 0,33 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 9.34 (b, 2H, N-H); 8.16, 8.04 (2d, 2H, $^3J=7.3$ Hz, H-6); 7.33-7.12 (m, 28H, arom. H); 7.05 (2d, 2H, $^3J=7.1$ Hz, H-5); 6.74 (m, 8H, arom. H); 6.19, 6.14 (2t, 2H, $^3J=6.3$ Hz, H1'); 4.45, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.11, 4.06 (2m, 2H, H4'); 3.70 (2s, 12H, O-CH₃); 3.45 (m, 4H, H5'); 3.36 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.63 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.58 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-); 2.48 (m, 2H, H2_α'); 2.13 (m, 2H, H2_β'); 1.83 (m, 4H, -CH₂-P); 1.22-0.99 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 128.35, 127.47

ESI-MS(+): berechnet: 836.0 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 835.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-benzoyladenoin 105



C₅₂H₅₇N₆O₆P [893,02]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin **94** (0,76 mmol), 0,39 g DIPEA (3,04 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,41 g 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75** (1,52 mmol); Reaktionszeit: 2,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 410 mg (61%)

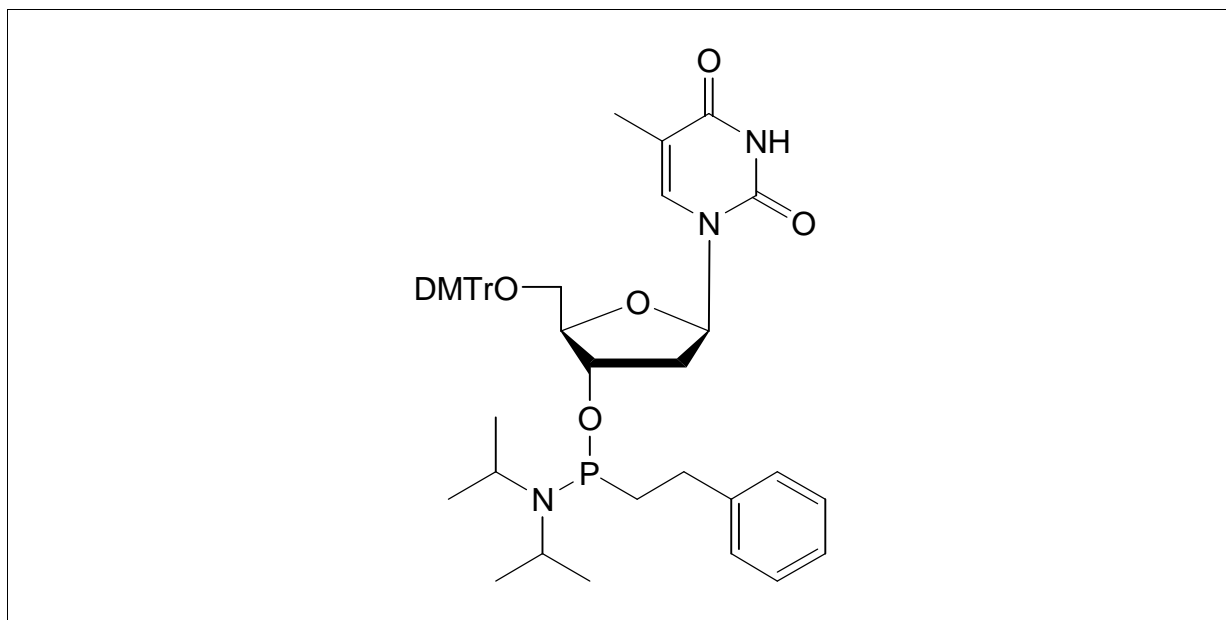
DC: R_f = 0,35 und 0,29 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.83 (b, 2H, N-H); 8.66 (2s, 2H, H-8); 8.09 (2s, 2H, H-2); 7.52-7.09 (m, 38H, arom. H); 6.70 (m, 8H, arom. H); 6.38 (m, 2H, H1'); 4.57 (m, 2H, H3'); 4.20 (m, 2H, H4'); 3.69 (2s, 12H, O-CH₃); 3.46 (m, 4H, H5'); 3.28 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.80 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-); 2.55 (m, 2H, H2_α'); 1.94 (m, 2H, H2_β'); 1.72 (m, 4H, -CH₂-P); 1.15-1.01 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
127.63, 126.29

ESI-MS(+): berechnet: 894.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 893.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin 106



C₄₅H₅₄N₃O₇P [779,37]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

400 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (0,73 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,6 g 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75** (4,68 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 483 mg (84%)

DC: R_f = 0,33 und 0,38 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8.16 (b, 2H, N-H); 7.68, 7.62 (2s, 2H, H-6); 7.41-7.15 (m, 28H, arom. H); 6.84 (m, 8H, arom. H); 6.39 (m, 2H, H1'); 4.57 (m, 2H, H3'); 4.12 (m, 2H, H4'); 3.80 (2s, 12H, O-CH₃); 3.52-3.29 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂-); 2.89 (m, 4H, C-HⁱPr); 2.62 (m, 2H, H2_α'); 2.32 (m, 2H, H2_β'); 1.79 (m, 4H, -CH₂-P); 1.57 (s, 6H, -CH₃(T)); 1.28-1.01 (m, 24H, -CH₃ⁱBu)

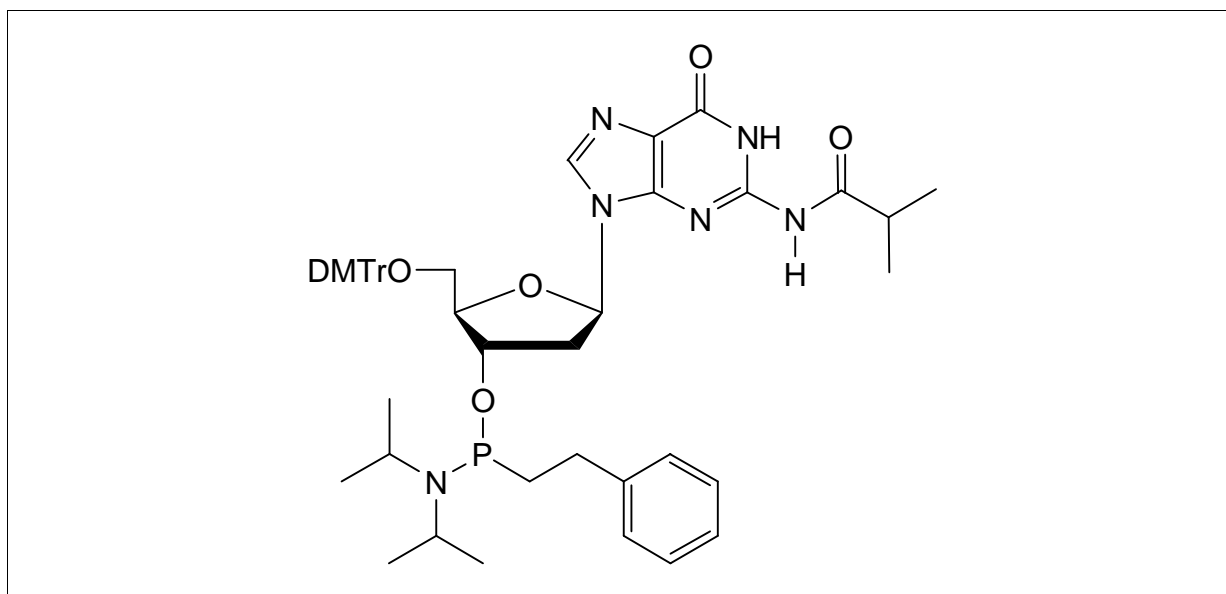
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

127.79, 127.51

ESI-MS(+): berechnet: 780.4 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 780.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*²-isobutyrylguanosin 107



$\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$ [876,43]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

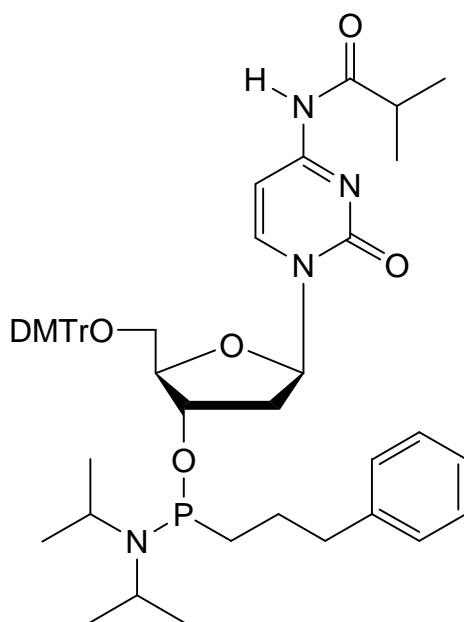
500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (0,78 mmol), 0,52 ml DIPEA (3,0 mmol), 10 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,8 g 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75** (2,97 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 533 mg (78%)

DC: R_f = 0,20 und 0,28 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
11.31 (b, 2H, N-H); 9.28 (b, 2H, N-H); 7.78 (m, 2H, H-8); 7.50-7.17 (m, 28H, arom. H); 6.78 (m, 8H, arom. H); 6.12 (m, 2H, H1'); 4.67 (m, 2H, H3'); 4.23, 4.15 (2m, 2H, H4'); 3.75 (2s, 12H, O-CH₃); 3.52 (m, 4H, H5'); 3.40 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-); 3.19 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.90 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.71, 2.64 (2m, 2H, H2 _{α}); 2.22 (m, 2H, H2 _{β}); 1.90 (m, 4H, -CH₂-P); 1.26-0.95 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
126.73, 126.19
- ESI-MS(+): berechnet: 877.4 m/z [M+H]⁺
gefunden: 875.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyrylcytidin 108



C₄₉H₆₁N₄O₇P [848,43]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

1,0 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (1,67 mmol), 1,0 ml DIPEA (5,6 mmol), 15 ml abs. CH₂Cl₂, 0,6 g 3-Phenylpropyl(diisopropylamin)chlorphosphan **76** (2,1 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 1,23 g (87%)

DC: R_f = 0,25 und 0,34 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

9.26 (s, 2H, N-H); 8.15, 8.06 (2d, 2H, ³J=7.2 Hz, H-6); 7.35-7.09 (m, 28H, arom. H) 7.01 (2d, 2H, ³J=7.3 Hz, H-5); 6.76 (m, 8H, arom. H); 6.14 (m, 2H, H1'); 4.47, 4.40 (2m, 2H, H3'); 4.08 (m, 2H, H4'); 3.72 (2s, 12H, O-CH₃); 3.39-3.28 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂); 3.20 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.63 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.52 (m, 2H, H2_α'); 2.09 (m, 2H, H2_β'); 1.91-1.72 (m, 8H, -CH₂-CH₂-P); 1.19-1.02 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

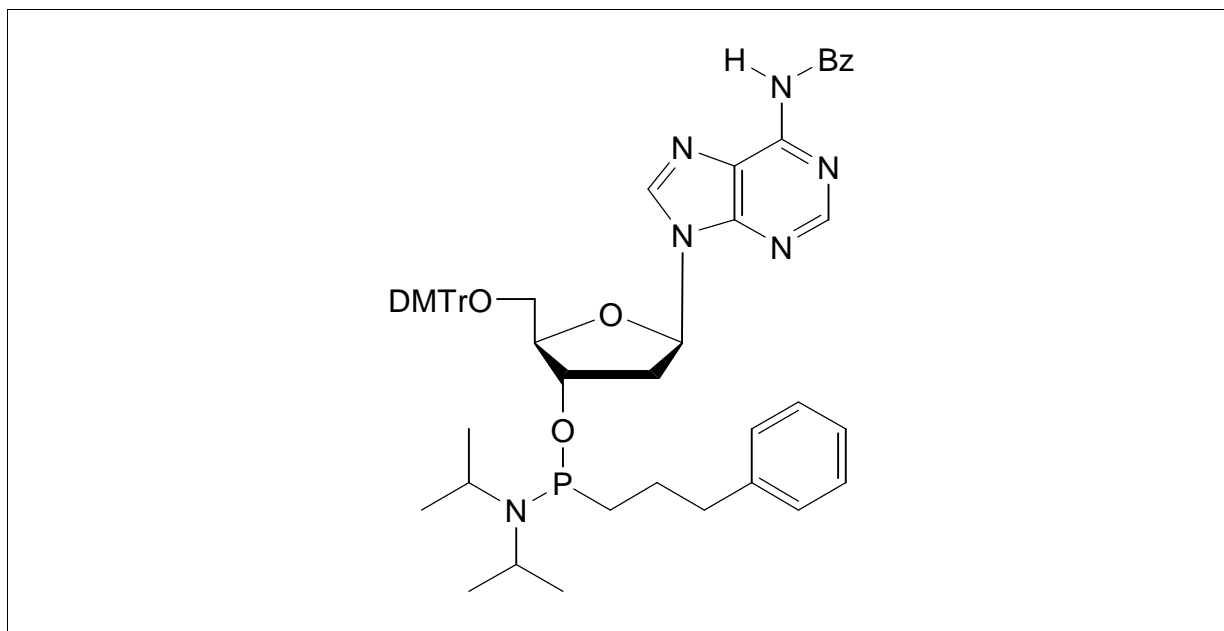
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)

128.37, 127.47

ESI-MS(+): berechnet: 849.4 m/z [M+H]⁺

gefunden: 849.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁶-benzoyladenosen 109



C₅₃H₅₉N₆O₆P [907,05]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

1,2 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin **94** (1,82 mmol), 0,71 ml DIPEA (7,3 mmol), 12 ml abs. CH₂Cl₂, 1,04 g 3-Phenylpropyl(diisopropylamin)chlorphosphan **76** (3,64 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 1,21 g (73%)

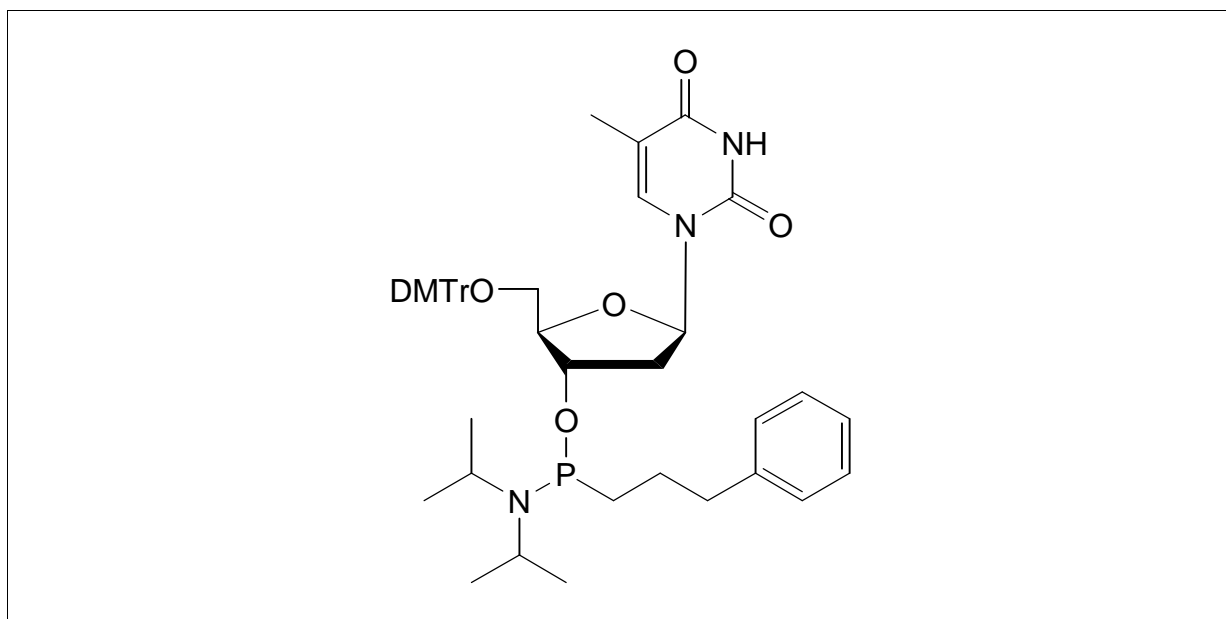
DC: R_f = 0,40 und 0,30 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

9.00 (b, 2H, N-H); 8.77 (2s, 2H, H-8); 8.19 (2s, 2H, H-2); 7.60-7.17 (m, 38H, arom. H); 6.68 (m, 8H, arom. H); 6.49 (m, 2H, H1'); 4.65 (m, 2H, H3'); 4.29 (m, 2H, H4'); 3.68 (2s, 12H, O-CH₃); 3.52 (m, 4H, H5'); 3.40-3.28 (m, 8H, C-H ⁱPr, C₆H₅-CH₂-); 2.88 (m, 2H, H2_α'); 2.53 (m, 2H, H2_β'); 1.78-1.55 (m, 8H, CH₂-CH₂-P); 1.15-1.01 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
116.58, 115.43
ESI-MS(+): berechnet: 908.0 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 907.7 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin 110



$\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$ [793,93]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

2,0 g 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (3,67 mmol), 1,43 ml DIPEA (14,68 mmol), 20 ml abs. CH_2Cl_2 , 1,57 g 3-Phenylpropyl(diisopropylamin)chlorphosphan **76** (5,51 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 2,13 g (73%)

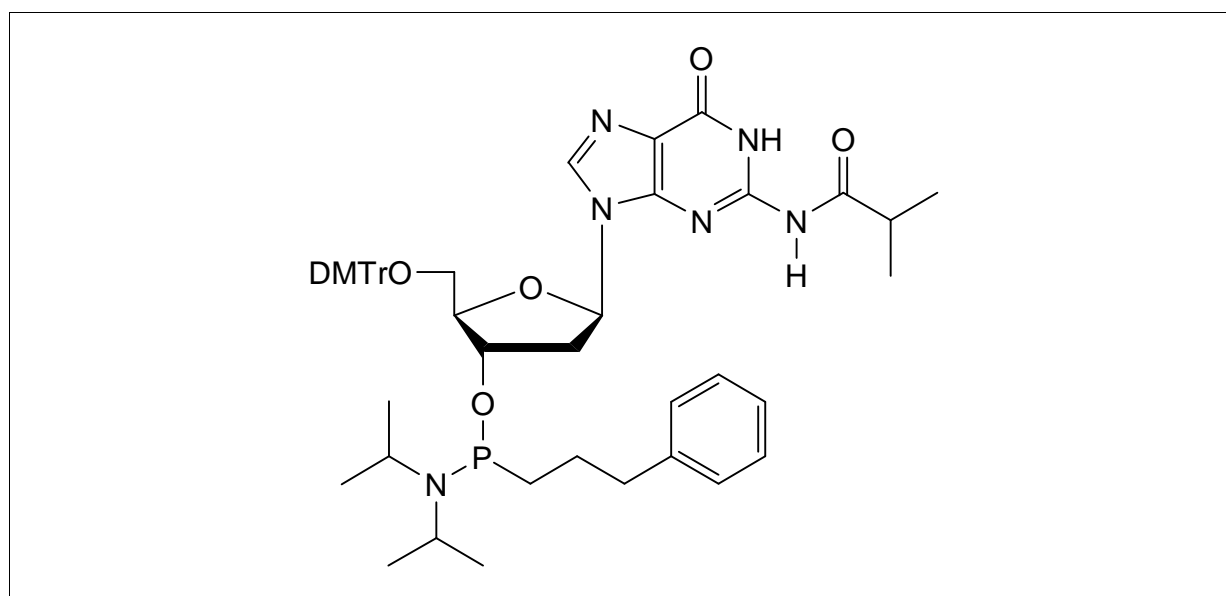
DC: R_f = 0,24 und 0,28 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 8.09 (b, 2H, N-H); 7.65 (2s, 2H, H-6); 7.42-7.13 (m, 28H, arom. H); 6.82 (d, 8H, arom. H); 6.39 (m, 2H, H1'); 4.55 (m, 2H, H3'); 4.09 (m, 2H, H4'); 3.79 (2s, 12H, O-CH₃); 3.50-3.27 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂-); 2.91 (m, 4H, C-HⁱPr); 2.60 (m, 2H, H2 _{α} '); 2.31 (m, 2H, H2 _{β} '); 1.79-1.70 (m, 8H, CH₂-CH₂-P); 1.69 (s, 6H, -CH₃(T)); 1.26-1.00 (m, 24H, -CH₃ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 127.25, 127.06

ESI-MS(+): berechnet: 794.9 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 794.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N²-isobutyrylguanosin 111



C₅₀H₆₃N₆O₇P [890,46]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (0,78 mmol), 0,60 ml DIPEA (3,5 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,5 g 3-Phenylpropyl(diisopropylamin)chlorphosphan **76** (1,8 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 410 mg (68%)

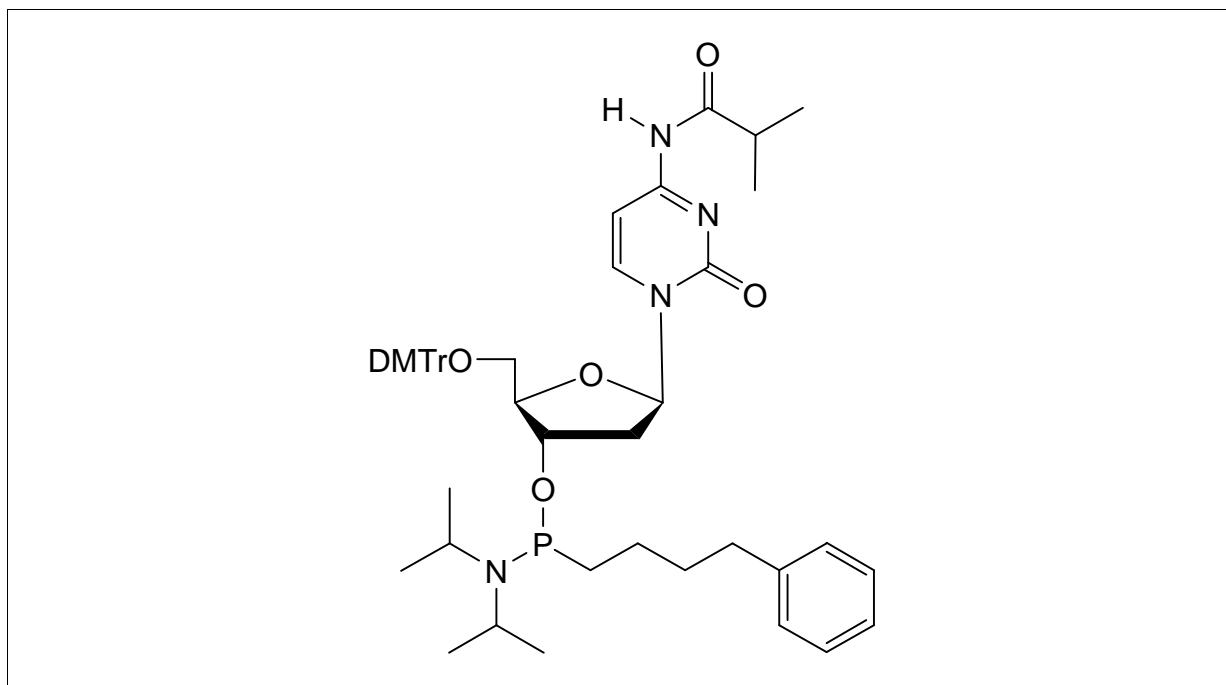
DC: $R_f = 0,14$ und $0,17$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
11.81 (b, 2H, N-H); 9.18 (b, 2H, N-H), 7.68 (m, 2H, H-8); 7.42-7.09 (m, 28H, arom. H); 6.70 (m, 8H, arom. H); 6.06 (m, 2H, H1'); 4.55 (m, 2H, H3'); 4.15, 4.07 (2m, 2H, H4'); 3.68 (2s, 12H, O-CH₃); 3.50 (m, 4H, H5'); 3.38-3.27 (m, 8H, C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 3.02 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.68-2.54 (2m, 2H, H2 _{α} '); 2.25 (m, 2H, H2 _{β} '); 1.65 (m, 8H, -CH₂-CH₂-P); 1.24-0.95 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
126.41, 125.74

ESI-MS(+): berechnet: 891.5 m/z [M+H]⁺
gefunden: 890.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(4-Phenylbutyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 112



C₅₀H₆₃N₄O₇P [863,03]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,57 ml DIPEA (3,16 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,42 g 4-Phenylbutyl(diisopropylamin)chlorphosphan **77** (1,4 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 0,64 g (89%)

DC: R_f = 0,26 und 0,36 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

9.37 (s, 2H, N-H); 8.22, 8.11 (2d, 2H, ³J=7.5 Hz, H-6); 7.41-7.10 (m, 28H, arom. H); 7.04 (m, 2H, H-5); 6.83 (m, 8H, arom. H); 6.29, 6.21 (2t, 2H, ³J=5.9 Hz, H1'); 4.52, 4.46 (2m, 2H, H3'); 4.19, 4.11 (2m, 2H, H4'); 3.78 (2s, 12H, O-CH₃); 3.49-3.37 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 2.71-2.54 (m, 8H, C-H

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 7.25-7.45 (m, 5H, C_6H_5); 2.20-2.10 (m, 6H, $\text{H}_{2\beta}'$, $\text{CH}_2\text{-P}$); 1.89-1.71 (m, 8H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.32-1.15 (m, 36H, $-\text{CH}_3$ ^iBu)

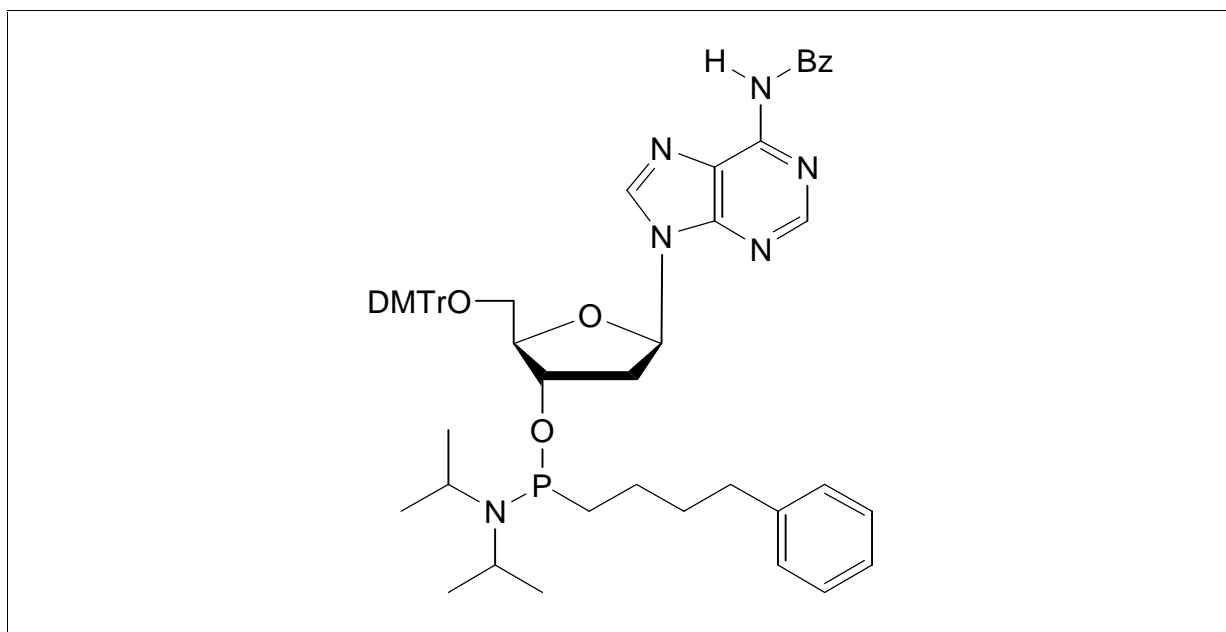
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

129.10, 128.80

ESI-MS(+): berechnet: 864.0 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 863.8 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(4-Phenylbutyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^6 -benzoyladenosen 113



$\text{C}_{54}\text{H}_{61}\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ [921,07]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^6 -benzoyl-2'-desoxyadenosin **94** (0,76 mmol), 0,53 ml DIPEA (3,04 mmol), 10 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,7 g 4-Phenylbutyl(diisopropylamin)chlorphosphan **77** (2,33 mmol); Reaktionszeit: 45 min; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 512 mg (73%)

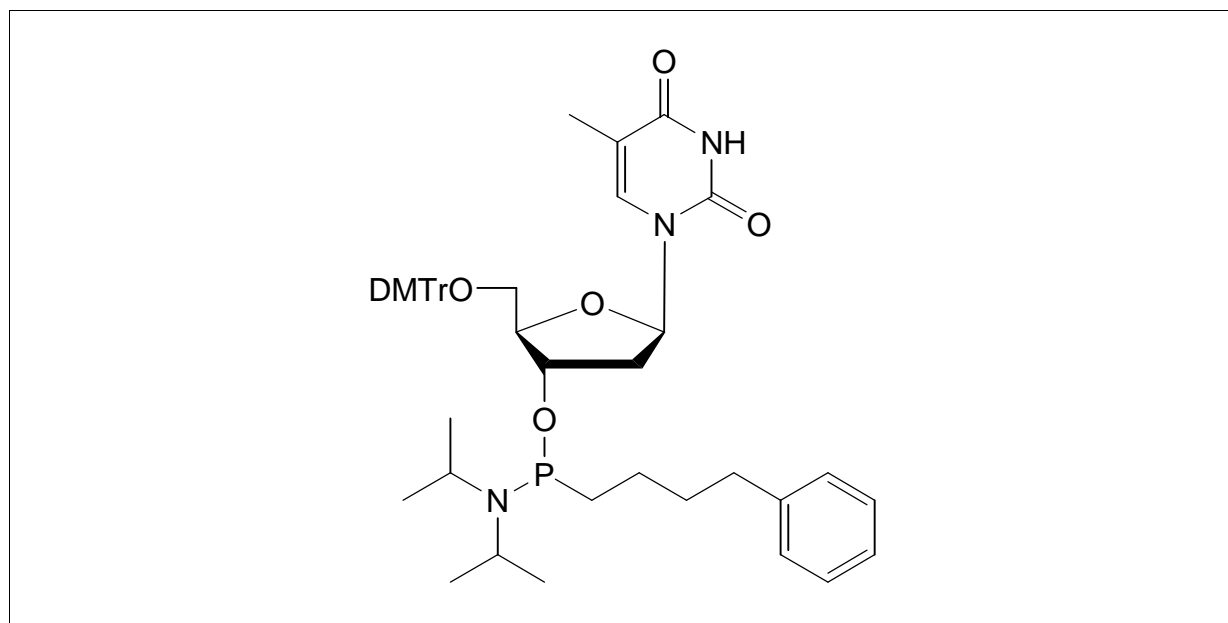
DC: $R_f = 0,19$ und $0,26$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.97 (s, 2H, N-H); 8.78 (2s, 2H, H-8); 8.19 (2s, 2H, H-2); 7.51-7.15 (m, 38H, arom. H); 6.79 (m, 8H, arom. H); 6.47 (m, 2H, H1'); 4.65 (m, 2H, H3'); 4.27 (m, 2H, H4'); 3.79 (2s, 12H, O-CH₃); 3.49 (m, 4H, H5'); 3.41-3.30 (m, 8H, C-H ⁱPr, C₆H₅-CH₂-); 2.85 (m, 1H, H2_α'); 2.70-2.55 (m, 3H, H2_α', H2_β'); 1.72 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-P); 1.47 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.21-1.05 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
128.47, 127.37

ESI-MS(+): berechnet: 922.1 m/z [M+H]⁺
gefunden: 921.5 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(4-Phenylbutyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin 114



C₄₇H₅₈N₃O₇P [807,95]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (0,92 mmol), 0,62 ml DIPEA (3,6 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,8 g 4-Phenylbutyl(diisopropylamin)chlorphosphan **77** (2,66 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 596 mg (80%)

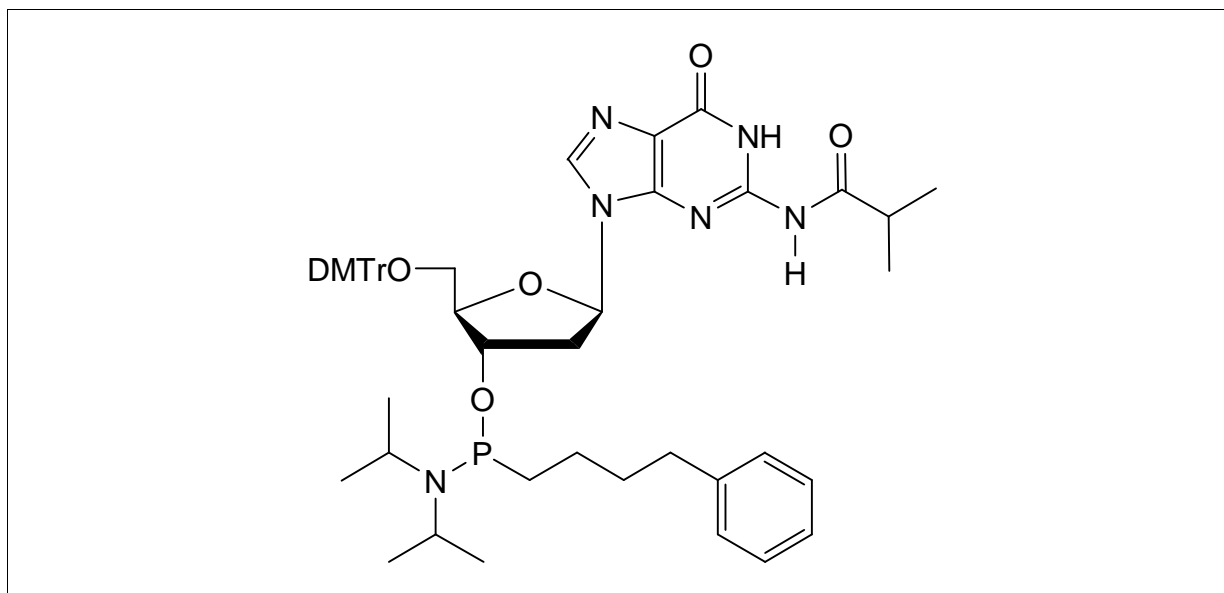
DC: R_f = 0,30 und 0,66 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.28 (b, 2H, N-H); 7.68, 7.63 (2s, 2H, H-6); 7.41-7.12 (m, 28H, arom. H); 6.85 (m, 8H, arom. H); 6.40 (m, 2H, H1'); 4.55 (m, 2H, H3'); 4.10 (m, 2H, H4'); 3.79 (2s, 12H, O-CH₃); 3.50-3.31 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂-); 2.69-2.58 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.42 (m, 2H, H2_α'); 2.29 (m, 2H, H2_β'); 1.78-1.61 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-P); 1.57 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.42 (s, 6H, -CH₃(T)); 1.17-0.98 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
128.06, 127.71

ESI-MS(+): berechnet: 809.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 808.5 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(4-Phenylbutyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N²-isobutyrylguanosin 115



C₅₁H₆₅N₆O₇P [905,07]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (0,78 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,88 mmol), 15 ml abs. CH₂Cl₂, 0,7 g 4-Phenylbutyl(diisopropylamin)chlorphosphan **77** (2,33 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/n-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 470 mg (67%)

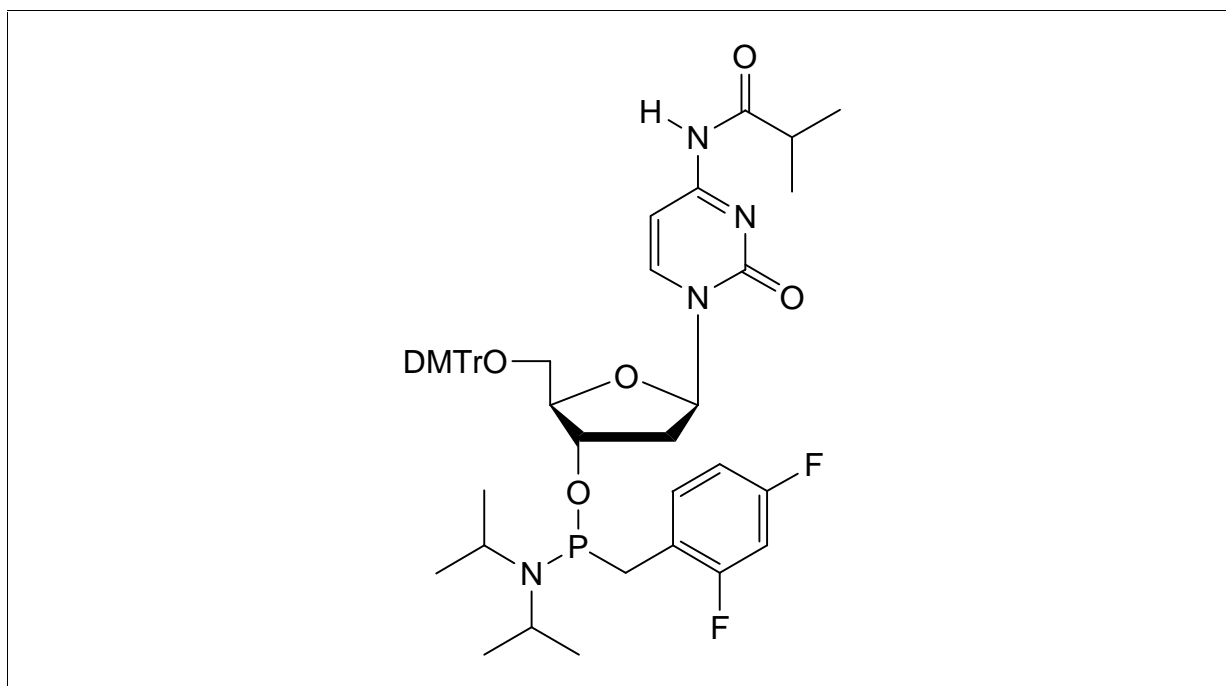
DC: R_f = 0,20 und 0,29 (Essigester/n-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

11.86 (b, 2H, N-H); 7.75 (2s, 2H, H-8); 7.50-7.11 (m, 28H, arom. H); 6.79 (m, 8H, arom. H); 6.10 (m, 2H, H1'); 4.63 (m, 2H, H3'); 4.20, 4.14 (2m, 2H, H4'); 3.78 (2s, 12H, O-CH₃); 3.54-3.36 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂); 3.20-2.99 (m, 4H, C-H ⁱPr); 2.69-2.58 (m, 3H, C-H ⁱBu, H2_α'); 2.46 (m, 2H, H2_α', H2_β'); 2.36 (m, 1H, H2_β'); 1.80-1.71 (m, 8H, -CH₂-CH₂-CH₂-P); 1.56-1.40 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.27-0.93 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
127.19, 126.65
ESI-MS(+): berechnet: 906.1 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 906.2 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

**3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-
5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin 116**



$\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ [856,93]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

800 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (1,33 mmol), 0,8 ml DIPEA (4,62 mmol), 15 ml abs. CH_2Cl_2 , 1,0 g 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83** (3,4 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 0,62 g (54%)

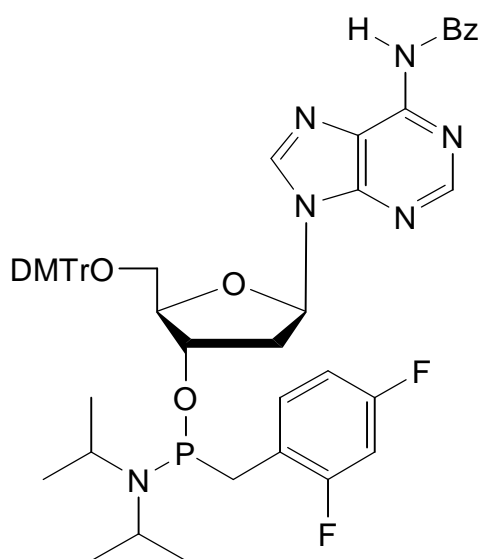
DC: R_f = 0,26 und 0,35 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 9.31 (b, 2H, N-H); 8.11, 7.99 (2d, 2H, $^3J=7.5$ Hz, H-6); 7.29-7.13 (m, 24H, arom. H); 7.02 (m, 2H, H-5); 6.75 (m, 8H, arom. H); 6.14 (m, 2H, H1'); 4.48, 4.40 (2m, 2H, H3'); 4.13 (m, 2H, H4'); 3.71 (m, 12H, O- CH_3); 3.53-3.21 (m, 12H, H5', $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$, C-H ^iPr); 2.73 (m, 2H, C-H ^iBu); 2.56 (m, 2H, H2 $_{\alpha}'$); 2.21 (m, 1H, H2 $_{\beta}'$); 2.04 (m, 1H, H2 $_{\beta}'$); 1.27-1.02 (m, 36H, $-\text{CH}_3$ ^iBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 127.08, 126.11

ESI-MS(+): berechnet: 857.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
 gefunden: 857.7 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^6 -benzoyladenosen 117



$\text{C}_{51}\text{H}_{53}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_6\text{P}$ [914,97]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

400 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin **94** (0,61 mmol), 0,4 ml DIPEA (2,31 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,5 g 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83** (1,7 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 438 mg (79%)

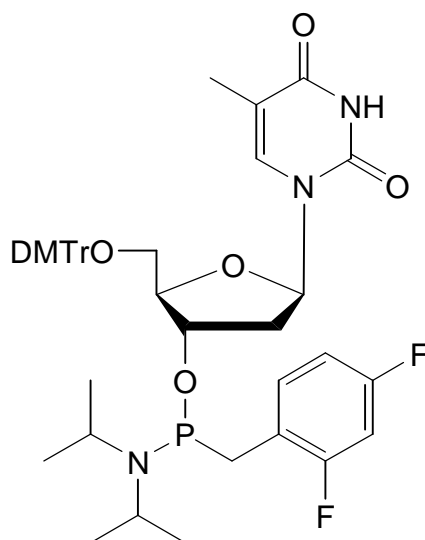
DC: R_f = 0,18 und 0,28 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.96 (2s, 2H, N-H); 8.79 (2s, 2H, H-8); 8.02 (m, 2H, H-2); 7.63-7.19 (m, 34H, arom. H); 6.78 (m, 8H, arom. H); 6.48, 6.21 (2m, 2H, H1'); 4.56, 4.51 (2m, 2H, H3'); 4.29, 3.95 (2m, 2H, H4'); 3.79 (2s, 12H, O-CH₃); 3.63 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 3.34 (m, 4H, -CH₂-P); 2.73 (m, 2H, H2_α'); 2.25 (m, 2H, H2_β'); 1.31-1.11 (m, 24H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
126.08, 125.57

ESI-MS(+): berechnet: 916.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 915.8 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin 118



C₄₄H₅₀F₂N₃O₇P [801,85]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

300 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin **95** (0,55 mmol), 0,3 ml DIPEA (1,73 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,5 g 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83** (1,7 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 280 mg (63%)

DC: R_f = 0,40 und 0,48 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

11.88 (b, 2H, N-H); 7.79, 7.71 (2s, 2H, H-6); 7.52-7.20 (m, 24H, arom. H); 6.78 (m, 8H, arom. H); 6.18, 6.09 (2m, 2H, H1'); 4.59, 4.51 (2m, 2H, H3'); 4.19, 3.95 (2m, 2H, H4'); 3.79 (m, 12H, O-CH₃); 3.63-3.51 (m, 8H, H5', C-HⁱPr); 3.26 (m, 4H, -CH₂-P); 2.65 (m, 2H, H2_α'); 2.02 (m, 2H, H2_β'); 1.71 (m, 6H, -CH₃(T)); 1.31-1.00 (m, 24H, -CH₃ⁱBu)

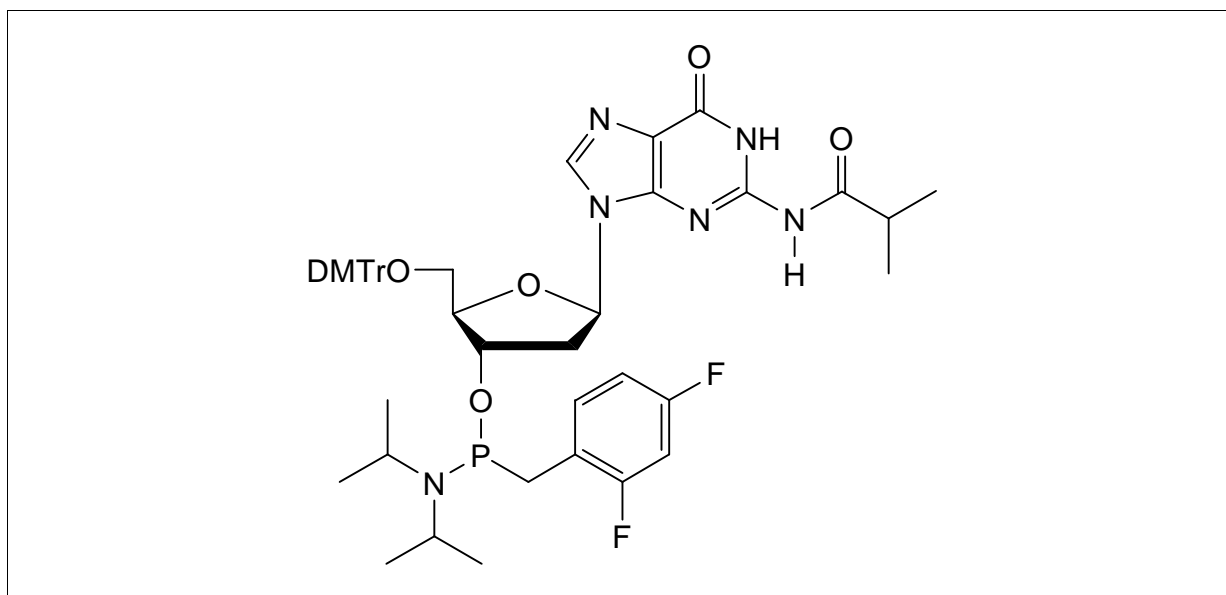
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

124.62, 123.79

ESI-MS(+): berechnet: 802.8 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 802.6 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^2 -isobutyrylguanosin 119



$\text{C}_{48}\text{H}_{57}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$ [898,97]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

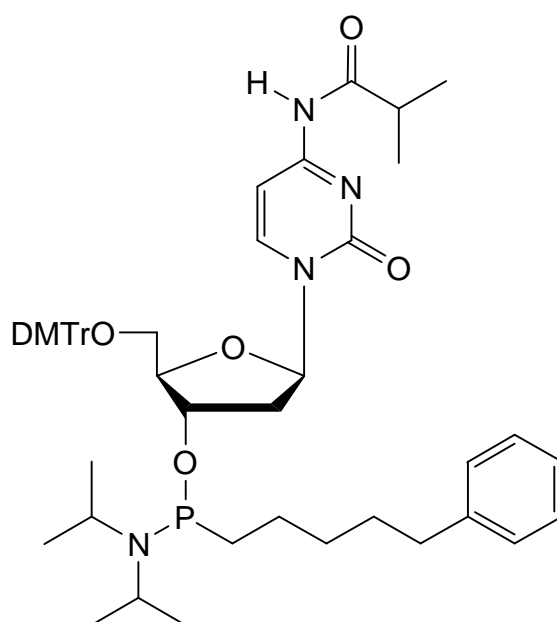
500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin **98** (0,78 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 15 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,6 g 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83** (2,0 mmol); Reaktionszeit: 3h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 265 mg (38%)

DC: R_f = 0,51 und 0,33 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 11.25 (b, 2H, N-H); 8.41 (b, 2H, N-H); 7.62, 7.59 (2s, 2H, H-8); 7.35-7.21 (m, 24H, arom. H); 6.82 (m, 8H, arom. H); 6.42-6.21 (m, 2H, H1'); 4.57 (m, 2H, H3'); 4.23, 4.17 (2m, 2H, H4'); 3.79 (m, 12H, O-CH₃); 3.66-3.39 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 3.17 (m, 4H, -CH₂-P); 2.77 (m, 4H, C-H ⁱBu); 2.52 (m, 2H, H2 _{α}); 2.30 (m, 1H, H2 _{β}); 2.13 (m, 1H, H2 _{β}); 1.38-1.03 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 126.81, 125.15
- ESI-MS(+): berechnet: 900.0 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 899.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(5-Phenylpentyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyrylcytidin 120



C₅₁H₆₅N₄O₇P [877,06]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

600 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (1,0 mmol), 0,72 ml DIPEA (4,0 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,53 g 5-Phenylpentyl(diisopropylamin)chlorphosphan **78** (1,7 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 0,76 g (86%)

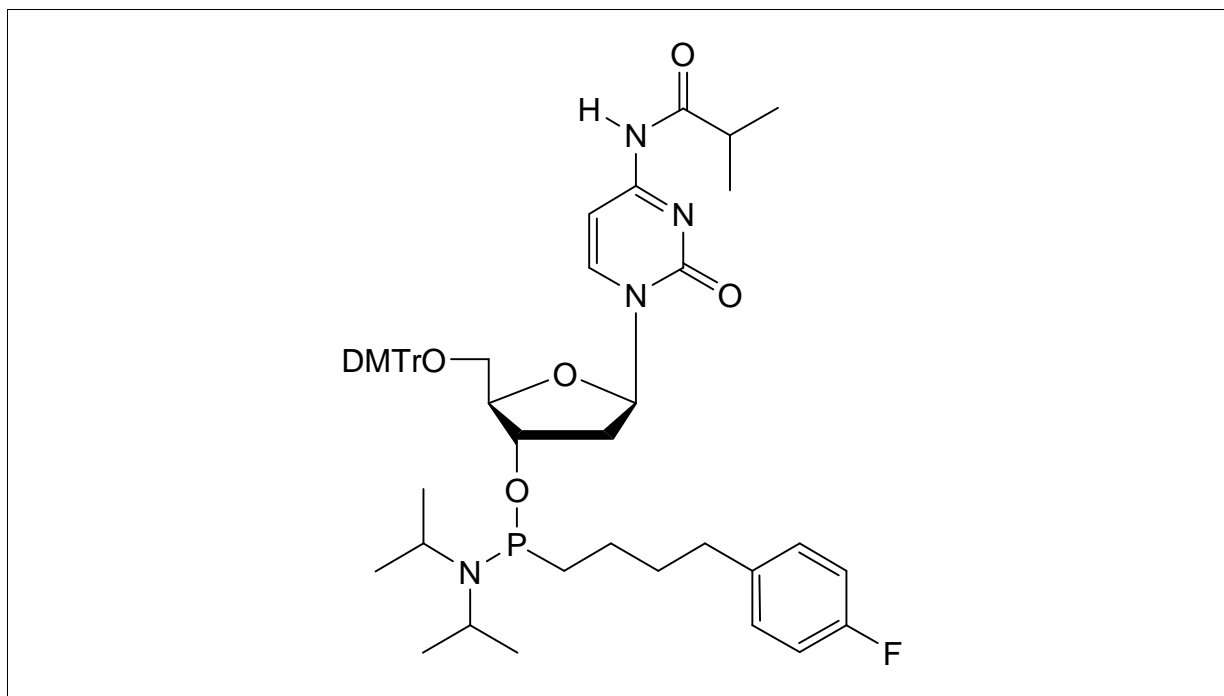
DC: R_f = 0,22 und 0,34 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
9.21 (s, 2H, N-H); 8.18, 8.07 (2d, 2H, ³J=7.5 Hz, H-6); 7.20-7.02 (m, 30H, arom. H, H-5); 6.76 (m, 8H, arom. H); 6.23, 6.14 (2t, 2H, ³J=5.8 Hz, H1'); 4.48, 4.36 (2m, 2H, H3'); 4.16, 4.04 (2m, 2H, H4'); 3.72 (2s, 12H, O-CH₃); 3.42-3.31 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 3.25 (m, 4H, C₆H₅-CH₂-); 2.65 (m, 4H, C-H ⁱBu); 2.60-2.45 (m, 6H, H2_α', CH₂-P); 2.15 (m, 2H, H2_β'); 1.81-1.62 (m, 12H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-P); 1.27-1.15 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
128.80, 128.46

ESI-MS(+): berechnet: 878.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 878.8 m/z [M+H]⁺

3'-O-[4-(4-Fluorphenylbutyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyrylcytidin 121



C₅₀H₆₂FN₄O₇P [881,02]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

300 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,50 mmol), 0,30 ml DIPEA (1,66 mmol), 8 ml abs. CH₂Cl₂, 0,32 g [4-(4-Fluorphenylbutyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **88** (1,0 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 340 mg (77%)

DC: R_f = 0,56 und 0,37 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8.24, 8.13 (2d, 2H, ³J=7.4 Hz, H-6); 7.40-7.09 (m, 26H, arom. H); 7.00 (m, 2H, H-5); 6.81 (m, 8H, arom. H); 6.28, 6.24 (2m, 2H, H1'); 4.54, 4.45 (2m, 2H, H3'); 4.19, 4.14 (2m, 2H, H4'); 3.80 (2s, 12H, O-CH₃); 3.47-3.38 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 2.70-2.52 (m, 8H, C-H ⁱBu, C₆H₅-CH₂-, H2_α'); 2.18-2.11

(m, 6H, $H_{2\beta}'$, CH_2 -P); 1.88-1.70 (m, 8H, $-CH_2-CH_2-CH_2$ -P); 1.30-1.11 (m, 36H, $-CH_3$ i Bu)

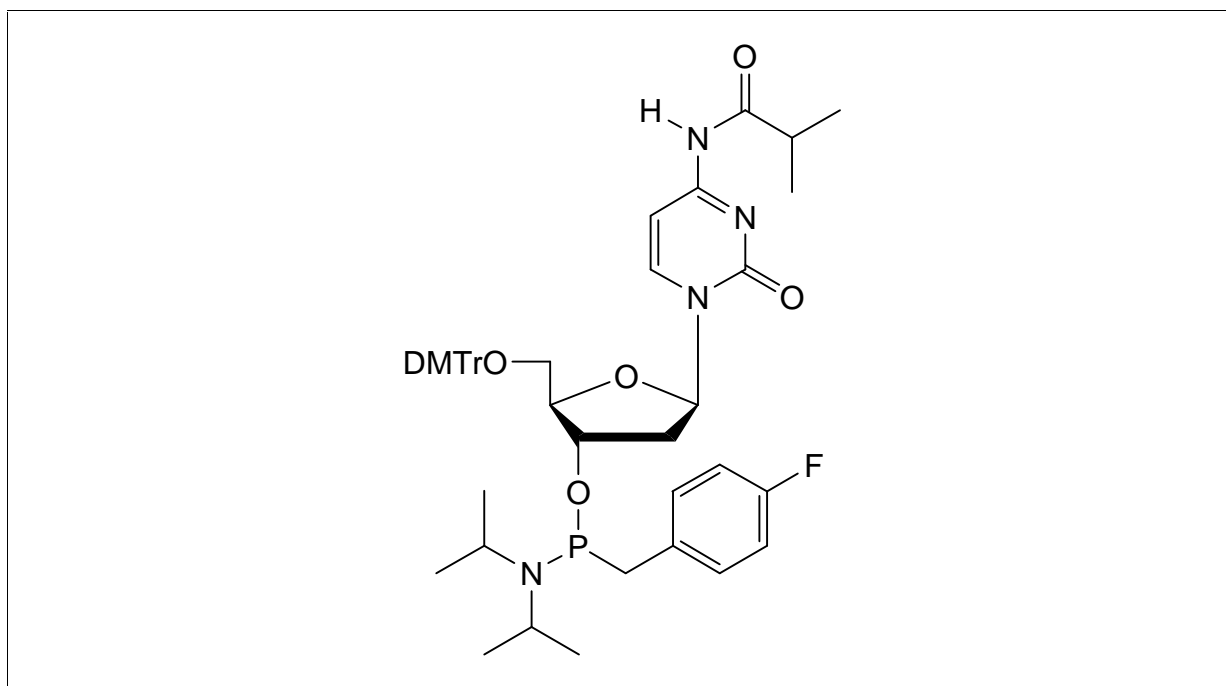
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

128.74, 128.51

ESI-MS(+): berechnet: 882.0 m/z $[M+H]^+$

gefunden: 881.6 m/z $[M+H]^+$

3'-O-[(4-Fluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **122**



$\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{FN}_4\text{O}_7\text{P}$ [838,94]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,8 g 4-Fluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **82** (2,9 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 637 mg (91%)

DC: $R_f = 0,39$ und $0,26$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)

8.26 (2s, 2H, N-H); 8.19, 8.07 (2d, 2H, $^3J=7.6$ Hz, H-6); 7.36-7.03 (m, 28H, arom. H, H-5); 6.82 (m, 8H, arom. H); 6.22 (m, 2H, H1'); 4.47, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.20 (m, 2H, H4'); 3.79 (m, 12H, O-CH₃); 3.57-3.15 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.72 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.51 (m, 1H, H2_α'); 2.39 (m, 1H, H2_α'); 2.20 (m, 1H, H2_β'); 2.01 (m, 1H, H2_β'); 1.29-1.01 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

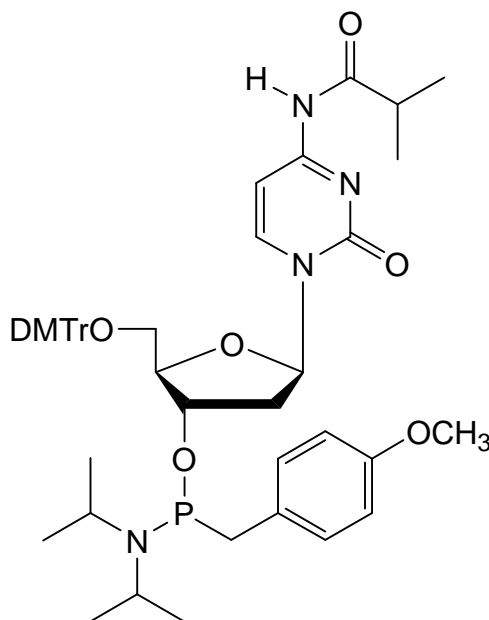
$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

128.32, 127.08

ESI-MS(+): berechnet: 639.9 m/z [M+H]⁺

gefunden: 639.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(*p*-Methoxybenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 123



C₄₈H₅₉N₄O₈P [850,98]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,7 g [p-Methoxybenzyl]diisopropylaminchlorphosphan **84** (2,43 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 276 mg (39%)

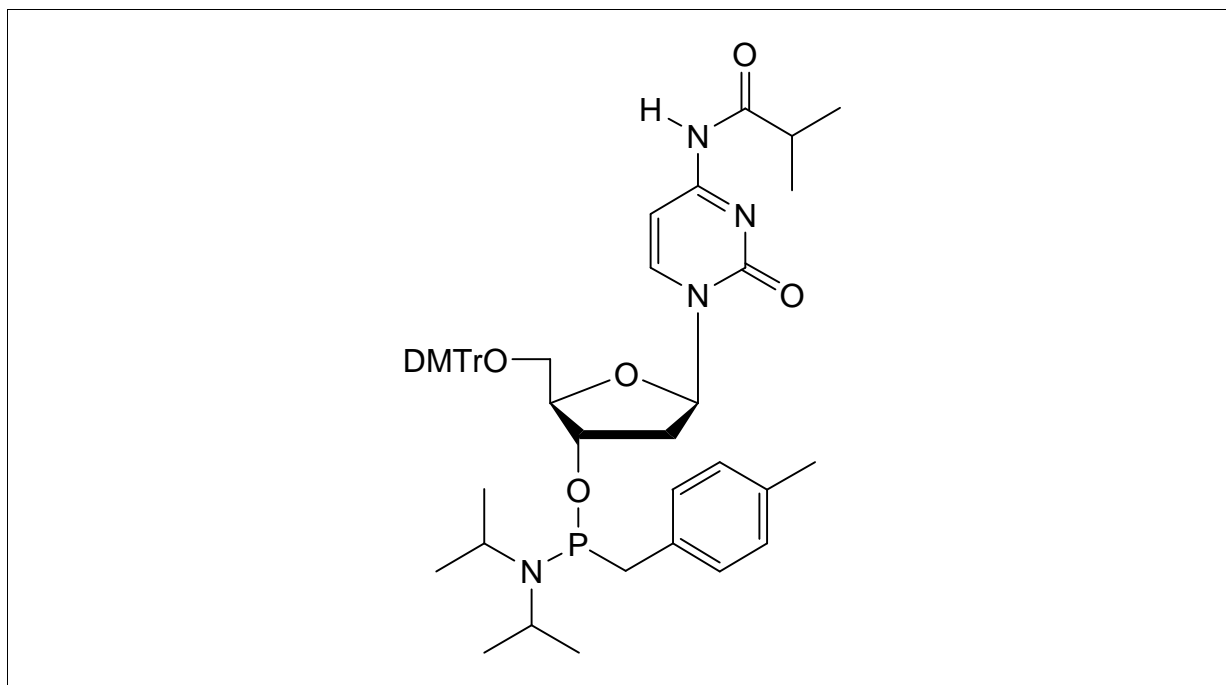
DC: R_f = 0,47 und 0,55 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.98 (b, 2H, N-H); 8.18, 8.05 (2d, 2H, ³J=7.6 Hz, H-6); 7.35-7.08 (m, 28H, arom. H, H-5); 6.82 (m, 8H, arom. H); 6.29, 6.22 (2m, 2H, H1'); 4.47, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.18 (m, 2H, H4'); 3.82 (m, 12H, O-CH₃ (DMTr)); 3.75 (m, 6H, O-CH₃); 3.64-3.10 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.71 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.63 (m, 2H, H2_α'); 2.26 (m, 1H, H2_β'); 1.99 (m, 1H, H2_β'); 1.30-1.07 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
117.21, 116.26

ESI-MS(+): berechnet: 852.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 851.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(p-Methylbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyrylcytidin 124



C₄₈H₅₉N₄O₇P [834,98]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,9 g (p-Methylbenzyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **85** (3,31 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 468 mg (67%)

DC: R_f = 0,43 und 0,54 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8.19, 8.09 (2d, 2H, ³J=7.4 Hz, H-6); 8.00 (b, 2H, N-H); 7.37-6.98 (m, 28H, arom. H, H-5); 6.83 (m, 8H, arom. H); 6.22 (m, 2H, H1'); 4.48, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.20 (m, 2H, H4'); 3.81 (m, 12H, O-CH₃); 3.69-3.12 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.70 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.52 (m, 2H, H2_α'); 2.30, 2.25

(2s, 12H, -CH₃); 2.21 (m, 1H, H_{2β}′); 2.00 (m, 1H, H_{2β}′); 1.29-1.01 (m, 36H, -CH₃ⁱBu)

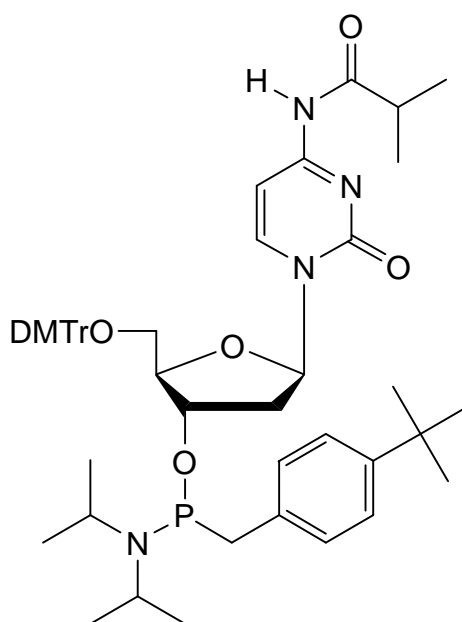
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)

129.36, 128.30

ESI-MS(+): berechnet: 836.0 m/z [M+H]⁺

gefunden: 835.8 m/z [M+H]⁺

3′-O-[(p-*t*-Butylbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2′-desoxy-5′-O-(4,4′-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 125



C₅₁H₆₅N₄O₇P [877,06]

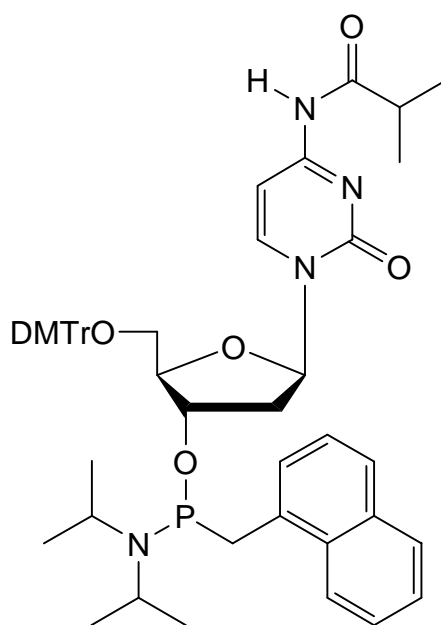
Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5′-O-(4,4′-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2′-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,90 mmol), 15 ml abs. CH₂Cl₂, 0,9 g (p-*t*-Butylbenzyl)(diisopropylamin)chlorphosphan **86** (2,87 mmol); Reaktionszeit: 3h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 257 mg (35%)

- DC: $R_f = 0,22$ und $0,41$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)
- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 8.21, 8.08 (2d, 2H, $^3J=7.5$ Hz, H-6); 7.99 (b, 2H, N-H); 7.36-7.01 (m, 28H, arom. H, H-5); 6.80 (m, 8H, arom. H); 6.21 (m, 2H, H1'); 4.48, 4.39 (2m, 2H, H3'); 4.19 (m, 2H, H4'); 3.80 (m, 12H, O-CH₃); 3.59-3.08 (m, 12H, H5', C₆H₅-CH₂-, C-H ⁱPr); 2.69 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.53 (m, 2H, H2 _{α} '); 2.20 (m, 1H, H2 _{β} '); 1.98 (m, 1H, H2 _{β} '); 1.33-0.84 (m, 54H, -CH₃ ⁱBu)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 128.72, 128.14
- ESI-MS(+): berechnet: 878.1 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 877.8 m/z [M+H]⁺

3'-O-(((Naphth-1-yl)methyl)(diisopropylamin)phosphan)-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 126



C₅₁H₆₀N₄O₇P [872,02]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

300 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,5 mmol), 0,36 ml DIPEA (2,0 mmol), 7 ml abs. CH₂Cl₂, 0,31 g [(Naphth-1-yl)methyl](diisopropylamin)chlorphosphan **79** (1,0 mmol); Reaktionszeit: 1,5h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 251 mg (58%)

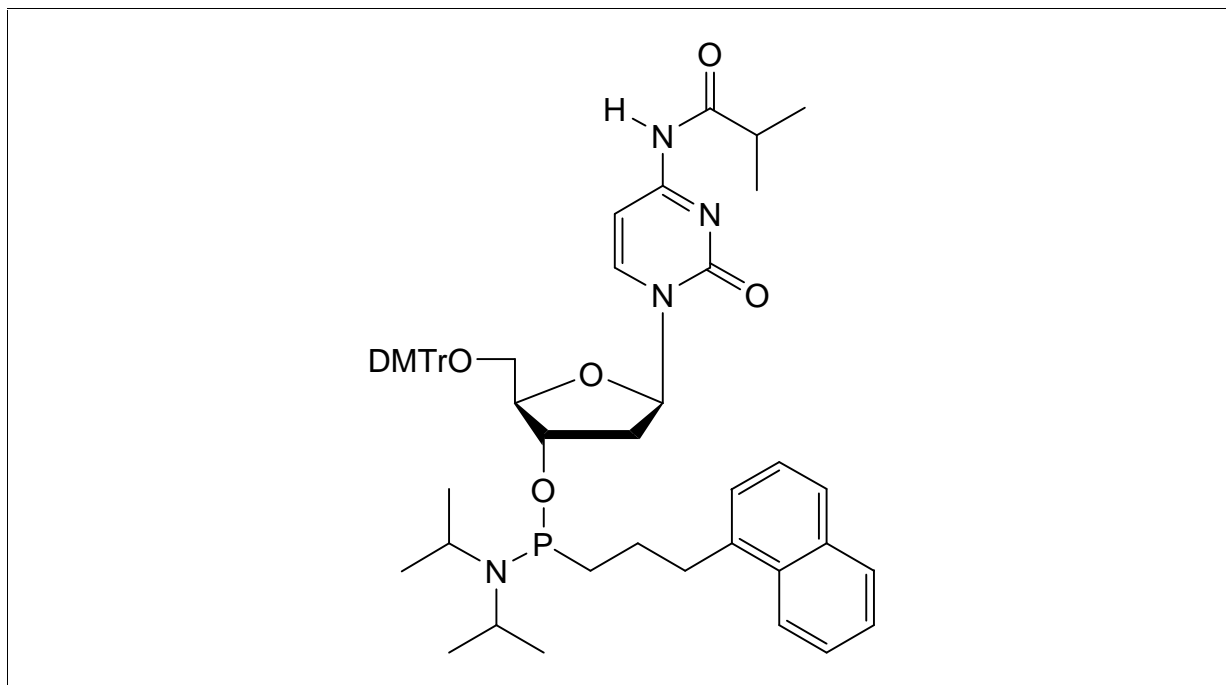
DC: R_f = 0,27 und 0,34 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
8.89 (s, 2H, N-H); 8.13, 8.07 (2d, 2H, ³J=7.1 Hz, H-6); 7.85 (m, 2H, arom. H); 7.65 (m, 2H, arom. H); 7.51 (m, 2H, arom. H); 7.34-7.12 (m, 24H, arom. H); 7.05 (m, 2H, H-5); 6.83 (m, 8H, arom. H); 6.26 (m, 2H, H1'); 4.53 (m, 2H, H3'); 4.26 (m, 2H, H4'); 3.79 (2s, 12H, O-CH₃); 3.62 (m, 4H, -CH₂-P); 3.51-3.32 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 2.71 (m, 4H, C-H ⁱBu); 2.54 (m, 2H, H2_α'); 2.19 (m, 2H, H2_β'); 1.38-1.10 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
126.74, 126.55

ESI-MS(+): berechnet: 873.0 m/z [M+H]⁺
gefunden: 872.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(3-(Naphth-1-yl)propyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 127



C₅₃H₆₄N₄O₇P [900,07]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

400 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,67 mmol), 0,43 ml DIPEA (2,4 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,67 g [3-(Naphth-1-yl)propyl] (diisopropylamin)chlorphosphan **80** (2,0 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 187 mg (31%)

DC: R_f = 0,22 und 0,29 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

9.24 (s, 2H, N-H); 8.12, 8.06 (2d, 2H, ³J=7.4 Hz, H-6); 7.98 (m, 2H, arom. H); 7.85 (m, 2H, arom. H); 7.72 (m, 2H, arom. H); 7.45-7.21 (m, 24H, arom. H); 7.05 (m, 2H, H-5); 6.85 (m, 8H, arom. H); 6.22 (m, 2H, H1'); 4.38 (m, 2H, H3'); 4.26 (m, 2H, H4'); 3.78 (2s, 12H, O-CH₃); 3.41 (m, 4H, C-H ⁱPr);

3.23 (m, 8H, H5', C₆H₅-CH₂-); 2.65 (m, 4H, C-H ⁱBu); 2.48 (m, 2H, H2'_α);
 2.15-2.02 (m, 6H, H2'_β, -CH₂-P); 1.75 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.46-1.15 (m,
 36H, -CH₃ ⁱBu)

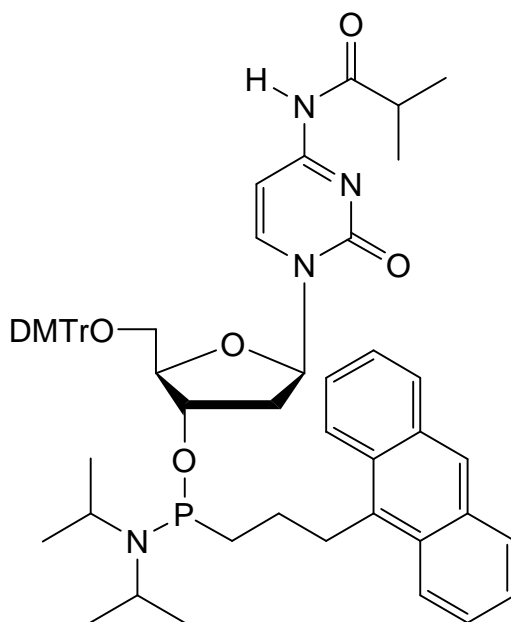
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)

127.95, 127.65

ESI-MS(+): berechnet: 901.1 m/z [M+H]⁺

gefunden: 899.6 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(3-(Anthracen-9-yl)propyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'- desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyrylcytidin 128



C₅₇H₆₆N₄O₇P [950,13]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

310 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,52 mmol), 0,30 ml DIPEA (1,7 mmol), 10 ml abs. CH₂Cl₂, 0,58 g [3-(Anthracen-9-yl)propyl] (diisopropylamin)chlorphosphan **81** (1,5 mmol); Reaktionszeit: 2h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 270 g (55%)

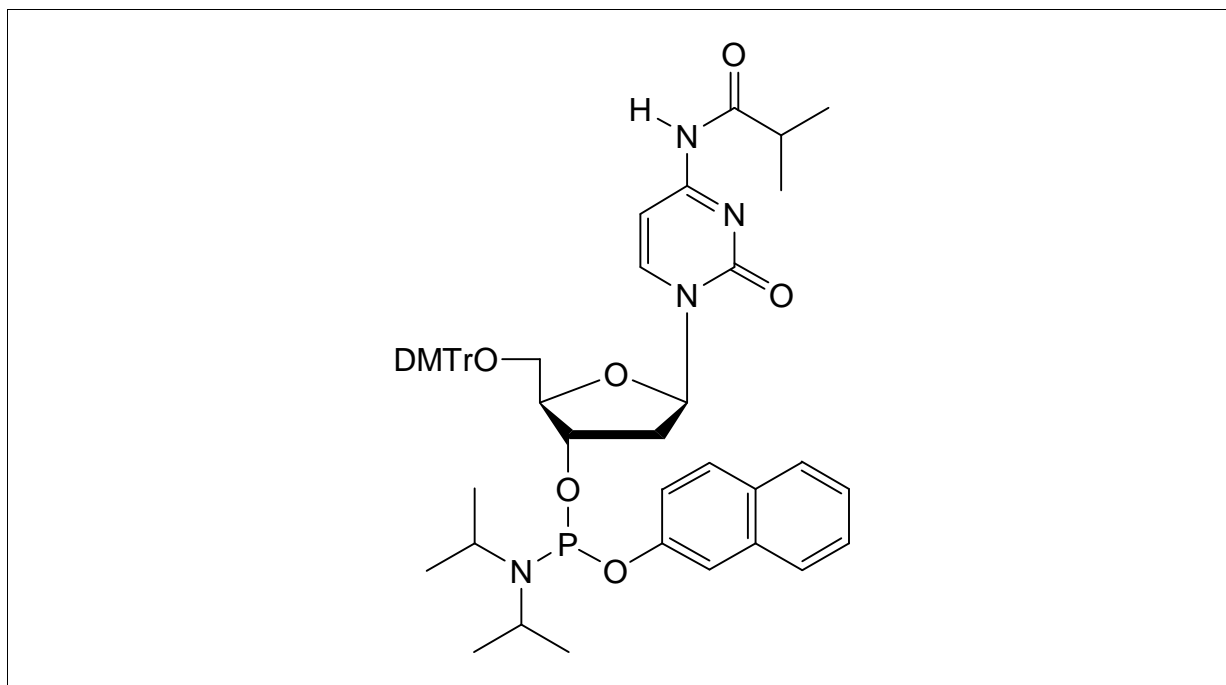
DC: $R_f = 0,34$ und $0,42$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
9.10 (s, 2H, N-H); 8.31-8.10 (m, 8H, arom. H, H-6); 8.02 (m, 4H, arom. H);
7.53-7.16 (m, 28H; arom. H, H-5); 6.86 (m, 8H, arom. H); 6.28 (m, 2H, H1');
4.52 (m, 2H, H3'); 4.17 (m, 2H, H4'); 3.82 (2s, 12H, O-CH₃); 3.57-
3.31 (m, 12H, H5', C-H ⁱPr, C₆H₅-CH₂-); 2.70-2.58 (m, 6H, H2 _{α} ', C-H ⁱBu);
2.21 (m, 2H, H2 _{β} '); 1.89 (m, 4H, CH₂-P); 1.68 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.35-
1.07 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
128.38, 127.92

ESI-MS(+): berechnet: 951.1 m/z [M+H]⁺
gefunden: 949.7 m/z [M+H]⁺

3'-O-[(2-Naphthoxy)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin 129



C₅₀H₅₇N₄O₈P [872,98]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,55 ml DIPEA (3,2 mmol), 5 ml abs. CH₂Cl₂, 0,7 g (2-Naphthoxy)(diisopropylamin)chlorphosphan **89** (2,0 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1.

Ausbeute: 510 mg (70%)

DC: R_f = 0,21 und 0,17 (Essigester/*n*-Hexan/TEA 70:29:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8.13, 8.11 (2d, 2H, ³J=7.7 Hz, H-6); 8.03 (b, 2H, N-H); 7.69-7.52 (m, 6H, arom. H); 7.34-7.08 (m, 20H, arom. H, H-5); 6.69 (2d, 8H, arom. H); 6.21 (m, 2H, H1'); 4.70, 4.62 (2m, 2H, H3'); 4.21, 4.19 (2m, 2H, H4'); 3.68, 3.60 (2s, 12H, O-CH₃); 3.65 (m, 4H, H5'); 3.37 (m, 8H, C-H ⁱPr); 2.76 (m, 2H, C-

^1H NMR: 2.46 (m, 2H, $\text{H}_{2\alpha}'$); 2.28-2.17 (m, 2H, $\text{H}_{2\beta}'$); 1.18-1.04 (m, 36H, - CH_3 ^iBu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

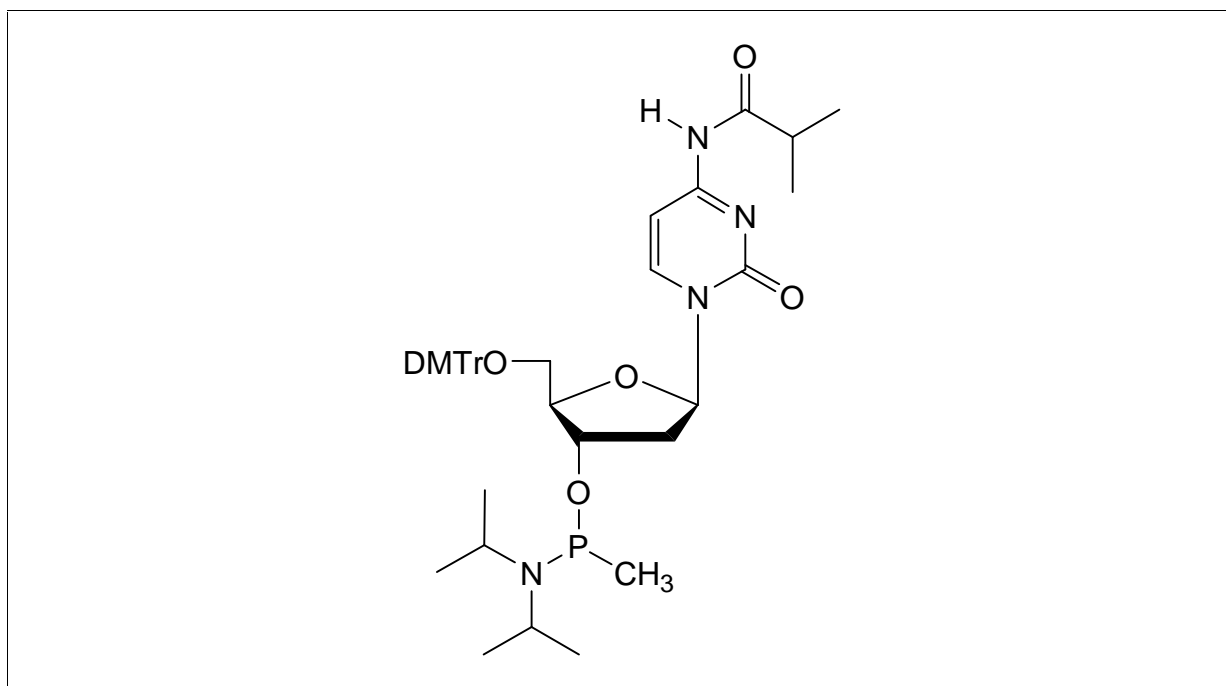
147.51, 146.85

ESI-MS(+): berechnet: 874.0 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 873.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

3'-O-[(Methyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **130**

Literatur: Löschner, 1988



$\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_7\text{P}$ [744,86]

Versuchsdurchführung: siehe allg. Arbeitsvorschrift auf Seite 238 mit:

500 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin **91** (0,83 mmol), 0,5 ml DIPEA (2,89 mmol), 10 ml abs. CH_2Cl_2 , 0,5 g Methyl(diisopropylamin)chlorphosphan **87** (2,75 mmol); Reaktionszeit: 1h; FC: Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1.

Ausbeute: 513 mg (82%)

DC: $R_f = 0,33$ und $0,41$ (Essigester/*n*-Hexan/TEA 50:49:1)

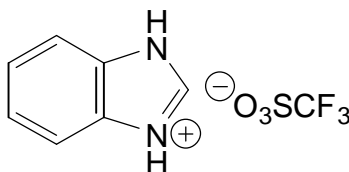
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.27, 8.11 (2d, 2H, $^3J=7.4$ Hz, H-6); 8.13 (b, 2H, N-H); 7.41-7.22 (m, 18H, arom. H); 7.09 (dd, 2H, H-5); 6.83 (m, 8H, arom. H); 6.29 (t, 1H, $^3J=6.3$ Hz, H1'); 6.22 (t, 1H, $^3J=6.4$ Hz, H1'); 4.53, 4.42 (2m, 2H, H3'); 4.19, 4.14 (2m, 2H, H4'); 3.79 (m, 12H, O-CH₃); 3.55-3.30 (m, 8H, H5', C-H ⁱPr); 2.74 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.55 (m, 4H, H2'); 2.20 (m, 2H, H2'); 1.70 (b, 6H, -CH₃); 1.29-1.01 (m, 36H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
123.52, 122.41

ESI-MS(+): berechnet: 745.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 745.6 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Benzimidazoliumtriflat 134

Literatur: Hayakawa, 1996



$\text{C}_8\text{H}_7\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [268,21]

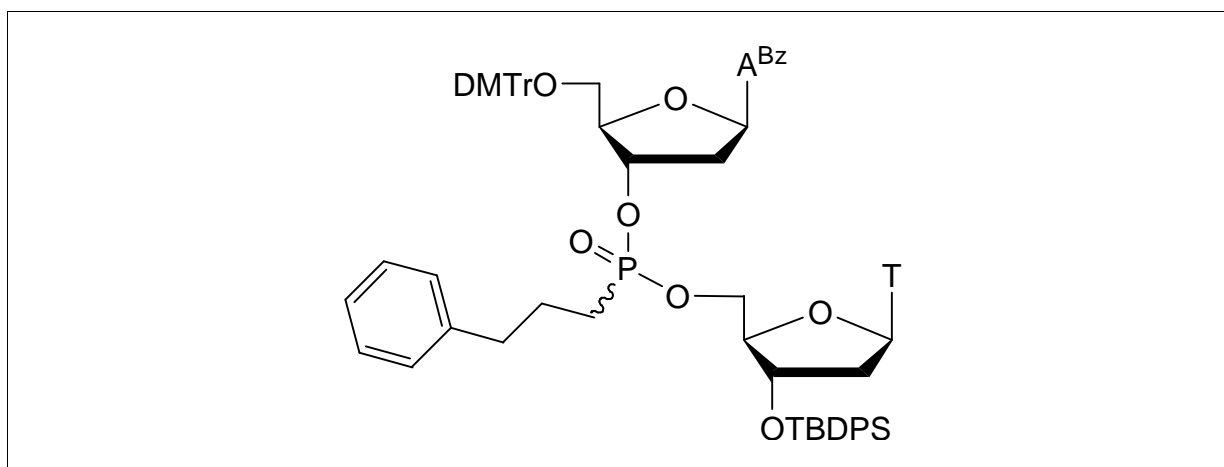
5,0 ml (55 mmol) Trifluormethansulfonsäure **133** wurden unter Argonatmosphäre in 80 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und mit einer Suspension aus 6,5 g Benzimidazol (55 mmol) in 70 ml Dichlormethan versetzt. Man liess 2h bei Raumtemperatur rühren, wobei das Rohprodukt in Form von hell violetten Nadeln ausfiel. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit abs. Dichlormethan gewaschen. Das reine Triflat (weiße Nadeln) wurde durch Umkristallisation aus Essigester/Acetonitril 4:1 erhalten.

Ausbeute: 13,1 g (88%)

Smp.: 192 °C

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, (d_6) -DMSO)
 14.24 (b, 2H, N-H); 9.82 (s, 1H, H8); 7.88 (m, 2H, arom. H); 7.57 (m, 2H, arom. H)

135Rp und 135Sp [*N*⁶-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat



C₇₃H₇₆N₇O₁₂PSi [1302,48]

In einem ausgeheizten und mit Argon gefluteten Kolben wurden 1,20 g 3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁶-benzoyladenosen **109** (1,32 mmol), 0,64 g 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **96** (1,32 mmol) sowie 0,70 g Benzimidazoliumtriflat **134** (2,64 mmol) eingewogen und 24h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach Befüllen mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen des Substanzgemisches in 40 ml abs. Acetonitril gestartet. Nach 45 min Rühren bei Raumtemperatur wurde 1,72 g *tetra*-Butylammoniumperiodat (3,96 mmol) (gelöst in 10 ml abs. CH₂Cl₂) zugegeben. Die braun-rot gefärbte Lösung wurde 10 min gerührt, mit 50 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 5%iger Na₂SO₃-Lösung, mit ges. Na₂CO₃-Lösung sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die jeweiligen wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und evaporiert. Das als weißer Schaum erhaltene Rohprodukt wurde mittels

Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) vorgereinigt. Die vollständige Aufreinigung sowie die Trennung der Diastereoisomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten aus Essigester/Isopropylamin 10:0,5 an einer Nucleoprep. 650 x 50 Säule.

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 135Sp

⇒ langsamer eluierendes Isomer

Ausbeute: 402 mg (23%)

DC: $R_f = 0,29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, (d_6) -DMSO)
11.35 (s, 1H, N-H(T)); 11.21 (s, 1H, N-H(A)); 8.59 (s, 1H, H-8(A)); 8.05 (s, 1H, H-2(A)); 8.03 (s, 1H, H-6(T)); 7.76-7.54 (m, 7H, arom. H); 7.46-7.31 (m, 10H, arom. H); 7.23-7.13 (m, 10H, arom. H); 7.08 (m, 2H, arom. H); 6.77 (m, 4H, arom. H); 6.46 (t, 1H, $^3J=6.8$ Hz, H1'(A)); 6.30 (dd, 1H, $^3J=6.9$ Hz, H1'(T)); 5.19 (m, 1H, H3'(A)); 4.32 (m, 1H, H3'(T)); 4.17 (q, 1H, H4'(A)); 4.03 (m, 1H, H4'(T)); 3.86 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(T)); 3.71 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(T)); 3.68 (s, 6H, O-CH₃); 3.27 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(A)); 3.21 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(A)); 3.17 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(A)); 2.58 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(A)); 2.55 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.11 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(T)); 1.99 (s, 3H, -CH₃ (T)); 1.96 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(T)); 1.74 (m, 2H, -CH₂-P); 1.70 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P); 1.02 (m, 9H, -CH₃ ^tBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
34.21

ESI-MS(-): berechnet: 1301.5 m/z [M-H]⁻
gefunden: 1303.2 m/z [M-H]⁻

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 135Rp

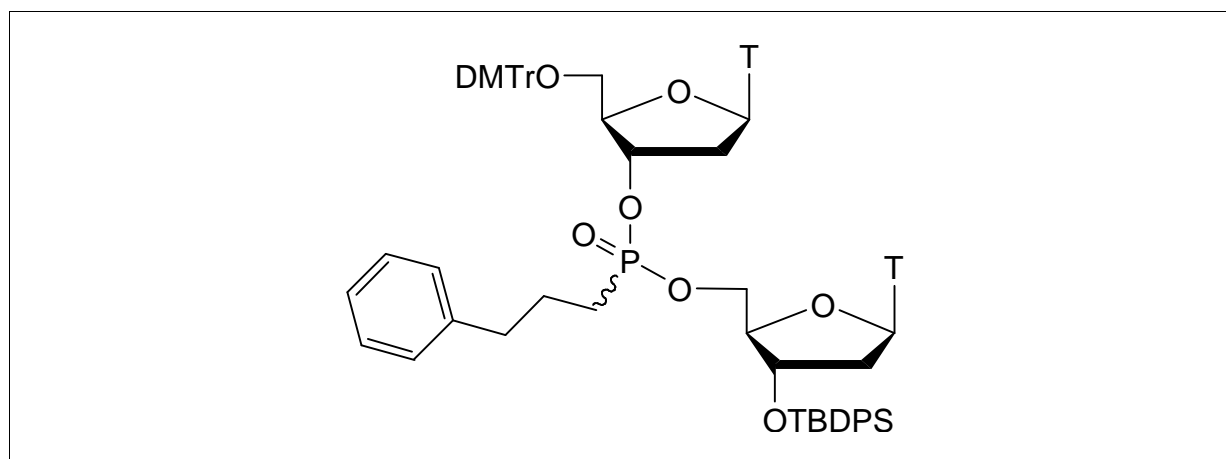
⇒ schneller eluierendes Isomer

Ausbeute: 459 mg (27%)

DC: $R_f = 0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

- ¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, (d₆)-DMSO)
 11.32 (s, 1H, N-H(T)); 11.21 (s, 1H, N-H(A)); 8.58 (s, 1H, H-8(A)); 8.07 (s, 1H, H-2(A)); 8.04 (s, 1H, H-6(T)); 7.66-7.54 (m, 7H, arom. H); 7.41-7.32 (m, 8H, arom. H); 7.25-7.17 (m, 12H, arom. H); 7.08 (m, 2H, arom. H); 6.89 (m, 4H, arom. H); 6.43 (t, 1H, ³J=6.9 Hz, H1'(A)); 6.26 (dd, 1H, ³J=5.8 Hz, H1'(T)); 5.19 (m, 1H, H3'(A)); 4.34 (m, 1H, H3'(T)); 4.14 (q, 1H, H4'(A)); 4.08 (q, 1H, H4'(T)); 3.92 (m, 1H, H5_α'(T)); 3.79 (m, 1H, H5_β'(T)); 3.70 (s, 6H, O-CH₃); 3.24 (m, 2H, H5'(A)); 3.11 (m, 1H, H2_α'(A)); 2.53 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, C₆H₅-CH₂); 2.46 (m, 1H, H2_β'(A)); 2.10 (m, 1H, H2_α'(T)); 2.02 (m, 1H, H2_β'(T)); 1.99 (s, 3H, -CH₃ (T)); 1.65 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.01 (m, 9H, -CH₃ ^tBu)
- ³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d₆)-DMSO)
 33.86
- ESI-MS(+): berechnet: 1303.5 m/z [M+H]⁺
 gefunden: 1303.1 m/z [M+H]⁺

136Rp und 136Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-thymidin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat



C₆₆H₇₃N₄O₁₃PSi [1188,47]

In einem ausgeheizten und mit Argon gefluteten Kolben wurden 1,0 g 3'-O-[(3-Phenylpropyl)(diisopropylamin)phosphan]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-thymidin **110** (1,26 mmol), 0,67 g 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-thymidin **96** (1,39 mmol) sowie 0,67 g Benzimidazoliumtriflat **134** (2,52 mmol) eingewogen und 24h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach Befüllen mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen des Substanzgemisches in 20 ml abs. Acetonitril gestartet. Nach 45 min Rühren bei Raumtemperatur wurde 1,30 g *tetra*-Butylammoniumperiodat (3,0 mmol) (gelöst in 10 ml abs. CH₂Cl₂) zugegeben. Die braun-rot gefärbte Lösung wurde 10 min gerührt, mit 50 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 5%iger Na₂SO₃-Lösung, mit ges. Na₂CO₃-Lösung sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die jeweiligen wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und evaporiert. Das als weißer Schaum erhaltene Rohprodukt wurde mittels Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 95:5) vorgereinigt. Die vollständige Aufreinigung sowie die Trennung der Diastereoisomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten aus (Methylacetat/Dioxan 10:1)/Hexan 1:1 an einer Nucleoprep. 650 x 50 Säule.

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 136Sp

⇒ langsamer eluierendes Isomer

Ausbeute: 0,39 g (26%)

DC: R_f = 0,37 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, (d₆)-DMSO)
11.52 (s, 1H, N-H(T3')); 11.45 (s, 1H, N-H(T5')); 7.67-7.64 (m, 4H, arom. H); 7.56-7.22 (m, 10H, arom. H); 7.17 (s, 1H, H-6(T3')); 7.16 (s, 1H, H-6(T5')); 6.94 (dd, 4H, arom. H); 6.35 (dd, 1H, ³J=6.0 Hz, H1'(T3')); 6.27 (t, 1H, ³J=6.8 Hz, H1'(T5')); 5.10 (m, 1H, H3'(T5')); 4.35 (m, 1H, H3'(T3')); 4.08 (m, 1H, H4'(T5')); 4.06 (m, 1H, H4'(T3')); 3.87 (m, 1H, H5_α'(T3')); 3.79 (s, 6H, O-CH₃); 3.69 (m, 1H, H5_β'(T3')); 3.28 (m, 2H, H5'(T5')); 2.60 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.42 (m, 1H, H2_α'(T5')); 2.17 (m, 1H, H2_β'(T5')); 2.15 (m, 1H, H2_α'(T3')); 2.02 (m, 1H, H2_β'(T3')); 1.76 (m, 2H, -CH₂-P); 1.73 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P); 1.68 (s, 3H, -CH₃(T5')); 1.46 (s, 3H, -CH₃(T3')); 1.10 (m, 9H, -CH₃ ^tBu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

34.38

ESI-MS(-): berechnet: 1187.5 m/z $[\text{M-H}]^-$

gefunden: 1188.0 m/z $[\text{M-H}]^-$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 136Rp

⇒ schneller eluierendes Isomer

Ausbeute: 0,21 g (21%)

DC: $R_f = 0,37$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

^1H -NMR: δ [ppm] (600 MHz, (d_6) -DMSO)

11.39 (s, 1H, N-H(T3')); 11.32 (s, 1H, N-H(T5')); 7.59 (m, 4H, arom. H); 7.46-7.21 (m, 10H, arom. H); 7.05 (s, 1H, H-6(T3')); 7.04 (s, 1H, H-6(T5')); 6.87 (dd, 4H, arom. H); 6.25 (dd, 1H, $^3J=6.1$ Hz, H1'(T3')); 6.16 (t, 1H, $^3J=7.0$ Hz, H1'(T5')); 5.00 (m, 1H, H3'(T5')); 4.32 (m, 1H, H3'(T3')); 4.07 (q, 1H, H4'(T3')); 4.01 (q, 1H, H4'(T5')); 3.87 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(T3')); 3.73 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(T3')); 3.71 (s, 6H, O-CH₃); 3.21 (m, 2H, H5'(T5')); 2.49 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.33 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(T5')); 2.21 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(T5')); 2.10 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(T3')); 1.99 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(T3')); 1.65 (s, 3H, -CH₃(T5')); 1.60 (m, 2H, -CH₂-P); 1.58 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P); 1.46 (s, 3H, -CH₃(T3')); 1.02 (m, 9H, -CH₃ ^tBu)

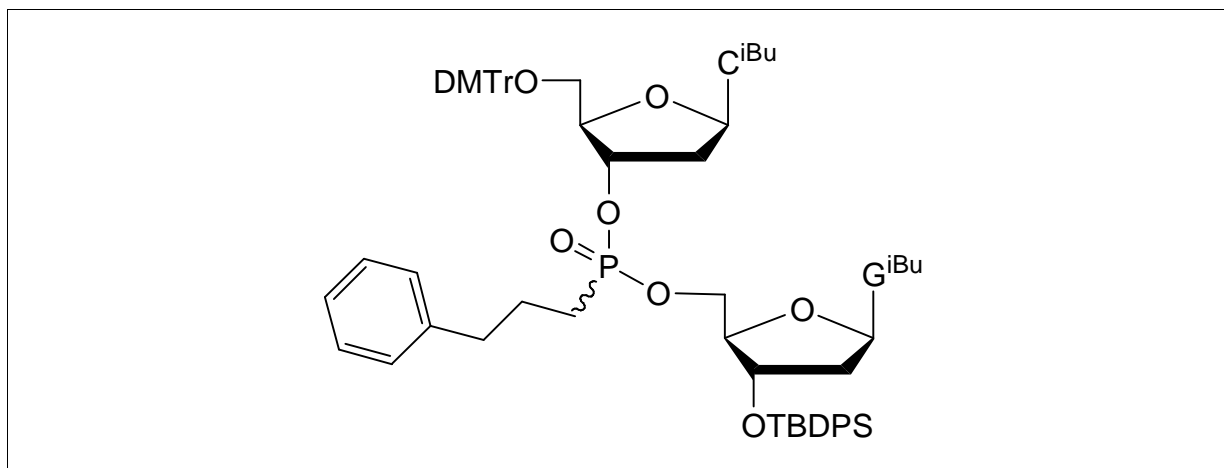
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

33.87

ESI-MS(+): berechnet: 1189.5 m/z $[\text{M+H}]^+$

gefunden: 1188.8 m/z $[\text{M+H}]^+$

137Rp und 137Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[*N*²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat



C₇₄H₈₇N₈O₁₃PSi [1355,59]

In einem ausgeheizten und mit Argon gefluteten Kolben wurden 3,94 g 3'-O-[3-Phenylpropyl](diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyrylcytidin **108** (4,64 mmol), 2,67 g *N*²-Isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99** (4,64 mmol) sowie 2,40 g Benzimidazoliumtriflat **134** (9,0 mmol) eingewogen und 24h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach Befüllen mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen des Substanzgemisches in 80 ml abs. Acetonitril gestartet. Nach 45 min Rühren bei Raumtemperatur wurde 4,43 g *tetra*-Butylammoniumperiodat (10 mmol) (gelöst in 20 ml abs. CH₂Cl₂) zugegeben. Die braun-rot gefärbte Lösung wurde 10 min gerührt, mit 100 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 5%iger Na₂SO₃-Lösung, mit ges. Na₂CO₃-Lösung sowie mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die jeweiligen wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und evaporiert. Das als weißer Schaum erhaltene Rohprodukt wurde mittels Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 95:5) vorgereinigt. Die vollständige Aufreinigung sowie die Trennung der Diastereoisomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten aus Methylacetat/Dioxan 10:1 an einer Nucleoprep. 650 x 50 Säule.

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 137Sp

⇒ langsamer eluierendes Isomer

Ausbeute: 2,98 g (48%)

DC: $R_f = 0,43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, (d_6) -DMSO)
12.04 (s, 1H, N-H); 11.51 (s, 1H, N-H); 10.89 (s, 1H, N-H); 8.10 (s, 1H, H-8(G)); 8.07 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.61 (m, 4H, arom. H); 7.41-7.12 (m, 13H, arom. H); 7.10 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 7.02 (m, 2H, arom. H); 6.82 (m, 4H, arom. H); 6.35 (dd, 1H, $^3J=5.7$ Hz, H1'(G)); 6.06 (t, 1H, $^3J=6.1$ Hz, H1'(C)); 4.89 (m, 1H, H3'(C)); 4.40 (m, 1H, H3'(G)); 4.09 (q, 1H, H4'(G)); 4.05 (q, 1H, H4'(C)); 3.88 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 3.69 (m, 7H, H5 $_{\beta}$ '(G), O-CH₃); 3.22 (m, 2H, H5'(C)); 2.75 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.67 (m, 2H, H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.48 (m, 3H, C₆H₅-CH₂, H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.36 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(G)); 2.30 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.68 (m, 2H, -CH₂-P); 1.63 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P); 1.09 (m, 12H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
34.34

ESI-MS(+): berechnet: 1356.6 m/z [M+H]⁺
gefunden: 1356.3 m/z [M+H]⁺

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 137Rp

⇒ schneller eluierendes Isomer

Ausbeute: 2,11 g (34%)

DC: $R_f = 0,43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, (d_6) -DMSO)
12.13 (s, 1H, N-H); 11.52 (s, 1H, N-H); 10.88 (s, 1H, N-H); 8.11 (s, 1H, H-8(G)); 8.08 (d, 1H $^3J=7.4$ Hz, H-6(C)); 7.60 (m, 4H, arom. H); 7.39-7.07 (m, 13H, arom. H); 7.01 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 6.88 (m, 4H, Arom. H); 6.32 (dd, 1H, H1'(G)); 6.08 (t, 1H, $^3J=6.4$ Hz, H1'(C)); 4.90 (m, 1H, H3'(C)); 4.43 (m, 1H, H3'(G)); 4.18 (q, 1H, H4'(G)); 4.07 (q, 1H, H4'(C));

3.92 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 3.89 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.71 (s, 6H, O-CH₃); 3.30-3.20 (m, 2H, H5'(C)); 2.72 (m, 3H, H2 $_{\alpha}$ '(G), C-H ^tBu); 2.43 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.38 (m, 2H, H2 $_{\beta}$ '(G), H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.20 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.54 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 1.11-1.02 (m, 12H, -CH₃ ^tBu).

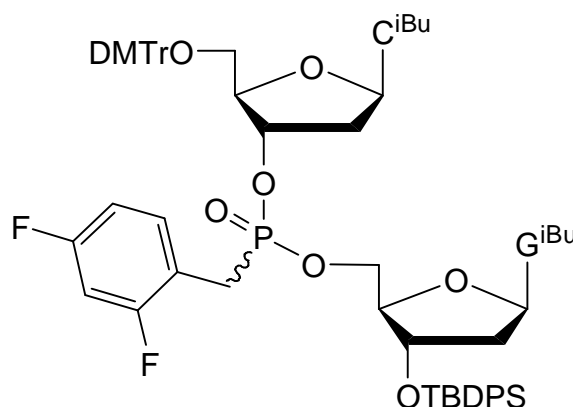
³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d₆)-DMSO)

34.00

ESI-MS(+): berechnet: 1356.6 m/z [M+H]⁺

gefunden: 1356.2 m/z [M+H]⁺

138Rp und 138Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[N²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin-5-yl] 2,4-difluorbenzylphosphonat



C₇₁H₇₇F₂N₈O₁₃PSi [1347,47]

In einem ausgeheizten und mit Argon gefluteten Kolben wurden 0,71 g 3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N²-isobutyrylcytidin **116** (0,829 mmol), 0,472 g N²-Isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin **99** (0,820 mmol) sowie 0,453 g Benzimidazoliumtriflat **134** (1,7 mmol) eingewogen und 24h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Nach Befüllen mit Argon wurde die Reaktion durch Lösen des Substanzgemisches in 14 ml abs. Acetonitril gestartet. Nach 45 min Rühren bei Raumtemperatur wurde 0,88 g *tetra*-Butylammoniumperiodat

(2,0 mmol) (gelöst in 10 ml abs. CH_2Cl_2) zugegeben. Die braun-rot gefärbte Lösung wurde 10 min gerührt, mit 50 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit 5%iger Na_2SO_3 -Lösung, mit ges. Na_2CO_3 -Lösung sowie mit ges. NaCl -Lösung gewaschen. Die jeweiligen wässrigen Phasen wurden mit CH_2Cl_2 reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und evaporiert. Das als weißer Schaum erhaltene Rohprodukt wurde mittels Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) vorgereinigt. Die vollständige Aufreinigung sowie die Trennung der Diastereoisomeren gelang durch präparative Normalphasen-HPLC mit einem Eluenten aus Methylacetat/Dioxan 10:1 an einer Nucleoprep. 650 x 50 Säule.

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 138Sp

⇒ langsamer eluierendes Isomer

Ausbeute: 0,47 g (42%)

DC: $R_f = 0,32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.06 (s, 1H, N-H); 11.52 (s, 1H, N-H); 10.88 (s, 1H, N-H); 8.10 (s, 1H, H-8(G)); 7.97 (d, 1H, $^3J=7.6$ Hz, H-6(C)); 7.61 (m, 4H, arom. H); 7.45 (m, 7H, arom. H); 7.29 (m, 4H, arom. H); 7.18 (m, 7H, arom. H); 7.07 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 6.86 (m, 4H, arom. H); 6.32 (dd, 1H, $^3J=5.7$ Hz, H1'(G)); 6.04 (t, 1H, $^3J=6.2$ Hz, H1'(C)); 4.98 (m, 1H, H3'(C)); 4.41 (m, 1H, H3'(G)); 4.14 (q, 1H, H4'(G)); 4.02 (q, 1H, H4'(C)); 3.92 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 3.79 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.72 (s, 6H, O-CH $_3$); 3.13-3.07 (m, 4H, H5'(C), -CH $_2$ -P); 2.72 (m, 2H, C-H ^iBu); 2.62 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.41 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.36 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(G)); 2.12 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.11-1.02 (m, 21H, -CH $_3$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
27.02

ESI-MS(+): berechnet: 1348.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 1347.7 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 138Rp

⇒ schneller eluierendes Isomer

Ausbeute: 0,23 g (21%)

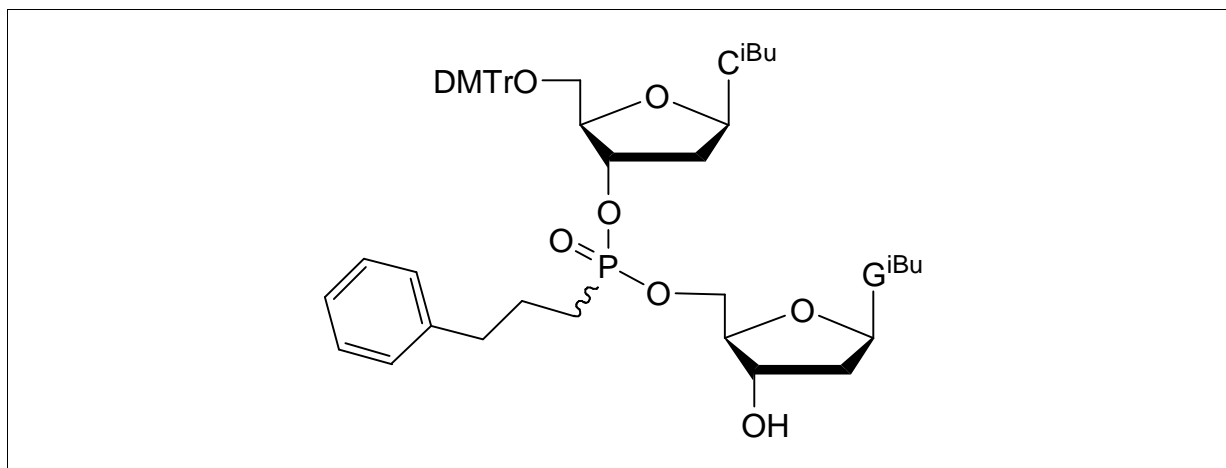
DC: $R_f = 0,32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.01 (s, 1H, N-H); 11.40 (s, 1H, N-H); 10.89 (s, 1H, N-H); 8.04 (s, 1H, H-8(G)); 8.01 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.59 (m, 4H, arom. H); 7.42 (m, 7H, arom. H); 7.25 (m, 4H, arom. H); 7.16 (m, 7H, arom. H); 7.08 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 6.80 (m, 4H, arom. H); 6.33 (dd, 1H, $^3J=5.4$ Hz, H1'(G)); 6.07 (t, 1H, $^3J=6.3$ Hz, H1'(C)); 4.88 (m, 1H, H3'(C)); 4.39 (m, 1H, H3'(G)); 4.08 (q, 1H, H4'(G)); 4.04 (q, 1H, H4'(C)); 3.79 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 3.73 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.69 (s, 6H, O-CH₃); 3.19-3.09 (m, 4H, H5'(C), -CH₂-P); 2.73 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.60 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.44 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.35 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(G)); 2.10 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.09-1.01 (m, 21H, -CH₃)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
27.63

ESI-MS(+): berechnet: 1348.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 1347.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

139Rp und 139Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat



C₅₇H₆₅N₈O₁₃P [1101,15]

2,0 g des Rp oder Sp konfigurierten [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[*N*²-isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **137** (1,49 mmol) wurden in 50 ml abs. THF gelöst und mit 6,5 ml *tert*-Butylammoniumfluorid-Lösung (5,85 mmol) versetzt. Nach 1,5h Rühren bei Raumtemperatur war die TBDPS-Gruppe vollständig abgespalten. Die Lösung wurde mit 200 ml CH₂Cl₂ versetzt und mit 5%iger NaHCO₃-Lösung (150 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ zweimal reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 139Sp

Ausbeute: 1,34 g (82%)

DC: R_f = 0,29 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.05 (s, 1H, N-H); 11.62 (s, 1H, N-H); 10.87 (s, 1H, N-H); 8.20 (s, 1H, H-8(G)); 8.08 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.37-7.13 (m, 13H, arom. H); 7.08 (d, 1H, $^3J=7.6$ Hz, H-5(C)); 6.85 (m, 4H, arom. H); 6.22 (t, 1H, $^3J=6.7$ Hz, H1'(C)); 6.11 (t, 1H, $^3J=6.1$ Hz, H1'(G)); 5.47 (d, 1H, $^3J=4.0$ Hz, OH-3'); 4.98 (m, 1H, H3'(C)); 4.40 (m, 1H, H3'(G)); 4.22 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 4.17 (m, 1H, H4'(C)); 4.03 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 4.00 (m, 1H, H4'(G)); 3.73 (s, 6H, O-CH₃); 3.29 (m, 2H, H5'(C)); 2.81 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.60 (m, 2H, H2 $_{\alpha}$ '(C), H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.50 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.27 (m, 2H, H2 $_{\beta}$ '(C), H2 $_{\beta}$ '(G)); 1.68 (m, 4H, -CH₂-CH₂-P); 1.10-1.03 (m, 12H, -CH₃ ⁱBu)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
34.03
- ESI-MS(+): berechnet: 1102.7 m/z [M+H]⁺
gefunden: 1101.7 m/z [M+H]⁺

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 139Rp

Ausbeute: 1,38 g (84%)

DC: $R_f = 0,30$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.02 (s, 1H, N-H); 11.58 (s, 1H, N-H); 10.85 (s, 1H, N-H); 8.15 (s, 1H, H-8(G)); 8.06 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.34-7.09 (m, 11H, arom. H); 7.05 (d, 1H, $^3J=7.4$ Hz, H-5(C)); 6.98 (m, 2H, arom. H); 6.83 (m, 4H, arom. H); 6.22 (t, 1H, $^3J=6.7$ Hz, H1'(G)); 6.08 (t, 1H, $^3J=6.1$ Hz, H1'(C)); 5.45 (d, 1H, $^3J=3.9$ Hz, OH-3'); 4.96 (m, 1H, H3'(C)); 4.34 (m, 1H, H3'(G)); 4.14 (m, 1H, H4'(C)); 4.07 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 3.99 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.94 (m, 1H, H4'(G)); 3.70 (s, 6H, O-CH₃); 3.25 (m, 2H, H5'(C)); 2.67 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.62 (m, 2H, H2 $_{\alpha}$ '(C), H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.52 (m, 2H, C₆H₅-CH₂); 2.32 (m, 2H, H2 $_{\beta}$ '(C), H2 $_{\beta}$ '(G)); 1.70 (m, 2H, -CH₂-P); 1.65 (m, 2H, -CH₂-CH₂-P); 1.06 (m, 12H, -CH₃ ⁱBu)

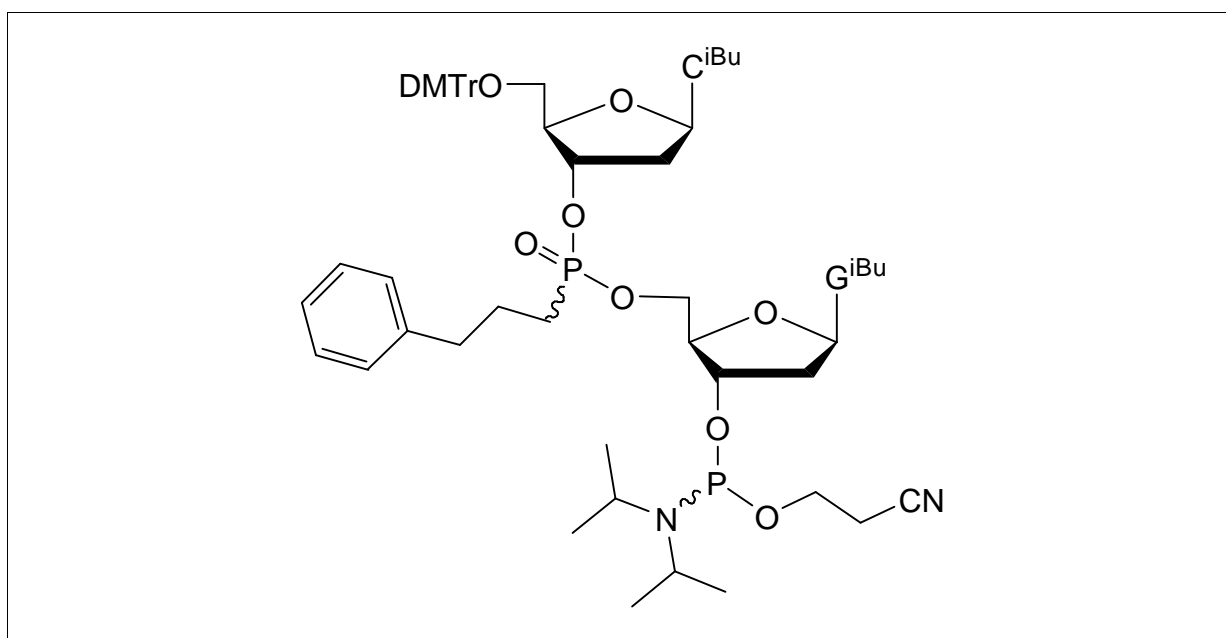
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

34.47

ESI-MS(+): berechnet: 1102.1 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 1101.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

140Rp und 140Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[3'-O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphoramidit)- N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat



$\text{C}_{66}\text{H}_{82}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2$ [1301,36]

250 mg des Rp oder Sp konfigurierten [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin] 3-phenylpropylphosphonat **139** (0,227 mmol) wurden in 15 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und unter Argonatmosphäre mit 0,17 ml DIPEA (1,0 mmol) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 69 μl Phosphorigsäure-mono-(2-cyanoethylester)-diisopropylamid-chlorid (0,3 mmol) getropft und 2h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 15 ml abs. CH_2Cl_2 verdünnt, auf 0°C gekühlt und mit 5 ml

5%iger NaHCO₃-Lösung versetzt. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit 30 ml Essigester reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: CH₂Cl₂/MeOH/TEA 94:5:1).

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 140Sp

Ausbeute: 232 mg (78%)

DC: R_f = 0,48; 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH/TEA 94:5:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
12.10 (b, 2H, N-H); 11.92 (b, 2H, N-H); 10.65 (b, 2H, N-H); 7.95 (m, 4H, H-8(G), H-6(C)); 7.26-7.11 (m, 26H, arom. H, H-5(C)); 6.80 (m, 8H, arom. H); 6.15 (m, 4H, H1'(C), H1'(G)); 4.99 (m, 2H, H3'(C)); 4.62 (m, 2H, H3'(G)); 4.22-3.97 (m, 8H, H5'(G), H4'(C), H4'(G)); 3.79 (s, 12H, O-CH₃)

³¹P-NMR: (162 MHz, CDCl₃)
150.22, 150.14 (Phosphoramidit); 34.07, 33.86 (3-Phenylpropyl phosphonat)

ESI-MS(+): berechnet: 1302.4 m/z [M+H]⁺
gefunden: 1301.8 m/z [M+H]⁺

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 140Rp

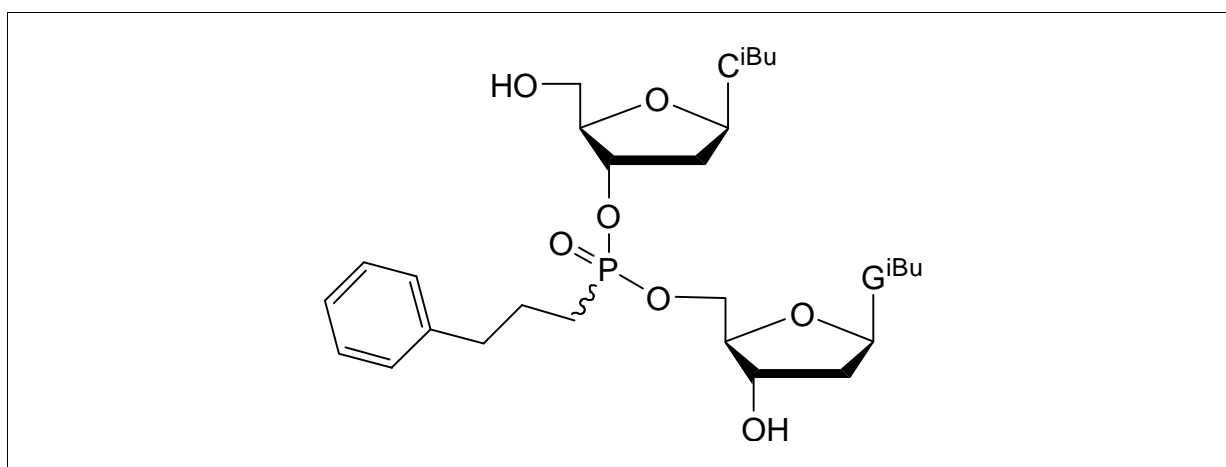
Ausbeute: 63 mg (53%)

DC: R_f = 0,44; 0,39 (CH₂Cl₂/MeOH/TEA 94:5:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
12.03 (b, 2H, N-H); 11.07 (b, 2H, N-H); 7.99 (2s, 2H, H-8(G)); 7.60 (m, 2H, H-6(C)); 7.31-7.20 (m, 24H, arom. H); 7.07 (m, 2H, H-5(C)); 6.84 (m, 8H, arom. H); 6.15 (m, 4H, H1'(C), H1'(G)); 5.11 (m, 2H, H3'(C)); 4.61, 4.57 (2m, 2H, H3'(G)); 4.34-4.11 (m, 8H, H5'(G), H4'(C), H4'(G)); 3.80 (s, 12H, O-CH₃)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 150.51, 150.33 (Phosphoramidit); 34.75, 34.51 (3-Phenylpropylphosphonat)
 ESI-MS(+): berechnet: 1302.4 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
 gefunden: 1301.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

141Rp und 141Sp (*N*⁴-Isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl)-(*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin) 3-phenylpropylphosphonat



$\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{P}$ [798,31]

440 mg des Sp bzw. Rp konfigurierten [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[*N*²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **139** (0,4 mmol) wurden in 40 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 60 ml 2%iger Benzolsulfonsäure-Lösung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3) versetzt. Nach 5-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die orange Lösung mit 400 ml 5%iger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit Dichlormethan reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert, einrotiert und der Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 9:1).

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 141Sp

Ausbeute: 240 mg (75%)

DC: $R_f = 0,14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.04 (s, 1H, N-H); 11.61 (s, 1H, N-H); 10.83 (s, 1H, N-H); 8.24 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 8.22 (s, 1H, H-8(G)); 7.28-7.14 (m, 6H, arom. H, H-5(C)); 6.25 (t, 1H, $^3J=6.7$ Hz, H1'(G)); 6.13 (t, 1H, $^3J=7.2$ Hz, H1'(C)); 5.48 (d, 1H, $^3J=4.0$ Hz, OH-3'); 5.15 (t, 1H, $^3J=5.2$ Hz, OH-5'); 4.93 (m, 1H, H3'(C)); 4.44 (m, 1H, H3'(G)); 4.24 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 4.10 (m, 2H, H4'(G), H4'(C)); 4.02 (m, 1H, H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.56 (m, 2H, H5'(C)); 2.80-2.68 (m, 3H, H2 $_{\alpha}$ '(G), C-H ^iBu); 2.59 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.55 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 2.35 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(G)); 2.17 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.76 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.71 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.07 (m, 12H, -CH_3 ^iBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
34.01

ESI-MS(+): berechnet: 799.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 799.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 141Rp

Ausbeute: 164 mg (52%)

DC: $R_f = 0,15$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.05 (s, 1H, N-H); 11.63 (s, 1H, N-H); 10.86 (s, 1H, N-H); 8.25 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 8.20 (s, 1H, H-8(G)); 7.26-7.11 (m, 6H, arom. H, H-5(C)); 6.25 (t, 1H, $^3J=6.6$ Hz, H1'(G)); 6.11 (t, 1H, $^3J=6.4$ Hz, H1'(C)); 5.51 (d, 1H, $^3J=3.9$ Hz, OH-3'); 5.19 (t, 1H, $^3J=5.2$ Hz, OH-5'); 4.96 (q, 1H, H3'(C)); 4.41 (pent., 1H, H3'(G)); 4.15 (m, 2H, H5'(G)); 4.09 (m, 1H, H4'(G)); 4.02 (m, 1H, H4'(C)); 3.57 (m, 2H, H5'(C)); 2.80-2.63 (m, 3H, H2 $_{\alpha}$ '(G), C-H ^iBu); 2.55 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 2.32 (m, 1H, H2 $_{\alpha}$ '(C)); 2.21 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(G)); 1.82 (m, 1H, H2 $_{\beta}$ '(C)); 1.72 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.68 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.05 (m, 12H, -CH_3 ^iBu)

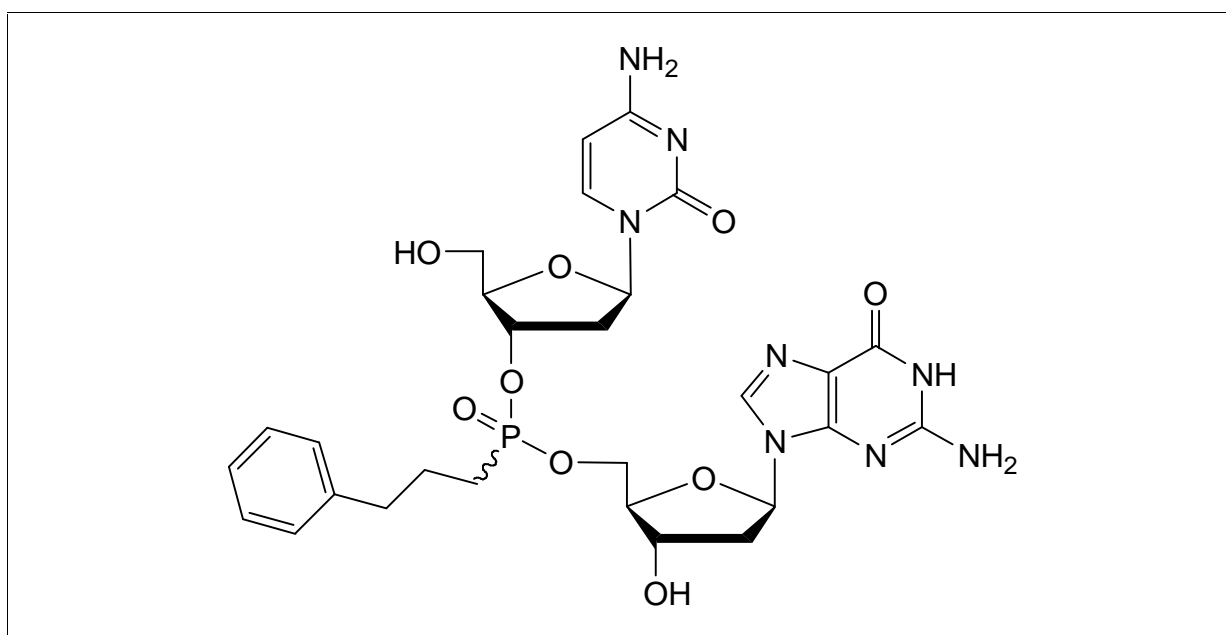
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

34.31

ESI-MS(+): berechnet: 799.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 799.7 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

142Rp und 142Sp (2'-Desoxycytidin-3-yl)-(2'-desoxyguanosin-5-yl) 3-phenylpropylphosphonat



$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_8\text{O}_9\text{P}$ [658,60]

240 mg des Sp bzw. Rp konfigurierten (N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl)-(N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl) 3-phenylpropylphosphonat **141** (0,3 mmol) wurden mit 20 ml 32%igem Ammoniak versetzt und 36h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ammoniak wurde einrotiert und der Rückstand mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt (Säule: RP-18e (5 μm) LiChrospher® 100, Merck). Gradient: A: H_2O ; B: MeOH; 0-100% B in 40 min, Flussrate: 3 ml/min.

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 142Sp

Ausbeute: 141 mg (71%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, (d_6) -DMSO)
10.88 (s, 1H, N-H(G)); 7.89 (s, 1H, H-8(G)); 7.76 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.31-7.13 (m, 7H, arom. H, $\text{NH}_2(\text{C})$); 6.60 (s, 2H, $\text{NH}_2(\text{G})$); 6.23 (t, 1H, $^3J=6.5$ Hz, $\text{H1}'(\text{C})$); 6.13 (t, 1H, $^3J=6.1$ Hz, $\text{H1}'(\text{G})$); 5.76 (d, 1H, $^3J=7.4$ Hz, H-5(C)); 5.44 (b, 1H, OH-3'); 5.10 (m, 1H, OH-5'); 4.93 (m, 1H, $\text{H3}'(\text{C})$); 4.39 (m, 1H, $\text{H3}'(\text{G})$); 4.20 (m, 1H, $\text{H5}_\alpha'(\text{G})$); 4.07 (m, 1H, $\text{H5}_\beta'(\text{G})$); 4.00 (q, 1H, $\text{H4}'(\text{C})$); 3.96 (q, 1H, $\text{H4}'(\text{G})$); 3.54 (m, 2H, $\text{H5}'(\text{C})$); 2.66 (m, 1H, $\text{H2}_\alpha'(\text{G})$); 2.59 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 2.36 (m, 1H, $\text{H2}_\alpha'(\text{C})$); 2.27 (m, 1H, $\text{H2}_\beta'(\text{G})$); 2.15 (m, 1H, $\text{H2}_\beta'(\text{C})$); 1.75 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.70 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
33.92

ESI-MS(+): berechnet: 659.6 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 659.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 142Rp

Ausbeute: 177 mg (89%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, (d_6) -DMSO)
10.92 (s, 1H, N-H(G)); 8.20 (s, 1H, H-8(G)); 7.78 (d, 1H, $^3J=7.3$ Hz, H-6(C)); 7.27-7.10 (m, 7H, arom. H, $\text{NH}_2(\text{C})$); 6.61 (s, 2H, $\text{NH}_2(\text{G})$); 6.24 (m, 1H, $\text{H1}'(\text{C})$); 6.15 (m, 1H, $\text{H1}'(\text{G})$); 5.75 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 5.44 (d, 1H, $^3J=4.0$ Hz, OH-3'); 5.12 (t, 1H, $^3J=5.2$ Hz, OH-5'); 4.98 (m, 1H, $\text{H3}'(\text{C})$); 4.39 (m, 1H, $\text{H3}'(\text{G})$); 4.13 (m, 2H, $\text{H5}'(\text{G})$); 4.01 (m, 1H, $\text{H4}'(\text{C})$); 3.97 (m, 1H, $\text{H4}'(\text{G})$); 3.54 (m, 2H, $\text{H5}'(\text{C})$); 2.62 (m, 1H, $\text{H2}_\alpha'(\text{G})$); 2.58 (m, 2H, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$); 2.34 (m, 1H, $\text{H2}_\alpha'(\text{C})$); 2.26 (m, 1H, $\text{H2}_\beta'(\text{G})$); 2.12 (m, 1H, $\text{H2}_\beta'(\text{C})$); 1.77 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-P}$); 1.73 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-P}$)

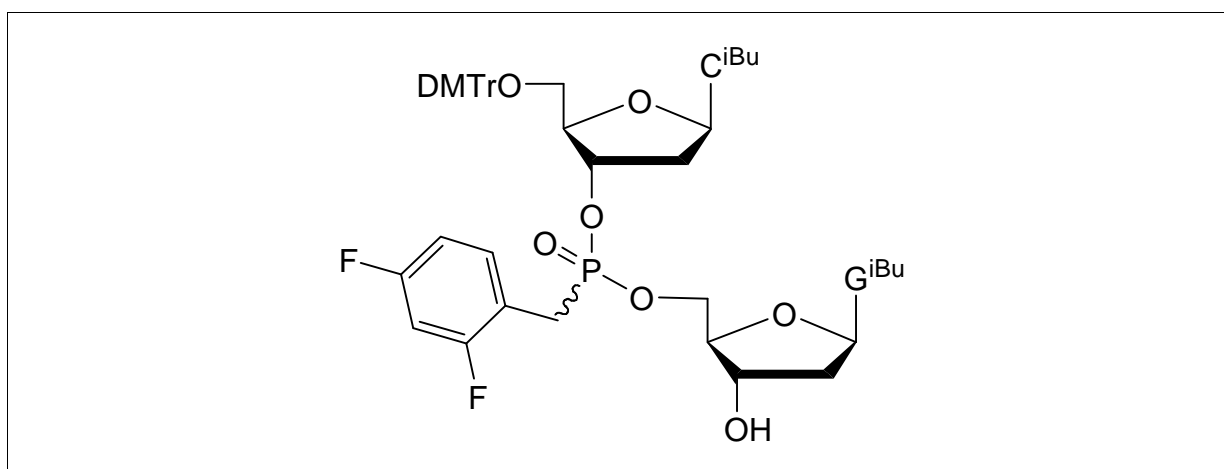
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

34.13

ESI-MS(+): berechnet: 659.6 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 659.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

143Rp und 143Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 2,4-difluorbenzylphosphonat



$\text{C}_{55}\text{H}_{61}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_{13}\text{P}$ [1111,09]

0,21 g des Rp oder Sp konfigurierten [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[N^2 -isobutyryl-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyguanosin-5-yl] 2,4-difluorbenzylphosphonat **138** (0,156 mmol) wurden in 5 ml abs. THF gelöst und mit 0,4 ml *tert*-Butylammoniumfluorid-Lösung (0,36 mmol) versetzt. Nach 1h Rühren bei Raumtemperatur war die TBDPS-Gruppe vollständig abgespalten. Die Lösung wurde mit 50 ml CH_2Cl_2 versetzt und mit 5%iger NaHCO_3 -Lösung (30 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 zweimal reextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5).

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 143Sp

Ausbeute: 109 mg (58%)

DC: $R_f = 0,14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
12.01 (s, 1H, N-H); 11.50 (s, 1H, N-H); 10.79 (s, 1H, N-H); 8.09 (s, 1H, H-8(G)); 7.91 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-6(C)); 7.27-7.09 (m, 11H, arom. H); 7.01 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 6.78 (m, 4H, arom. H); 6.24 (t, 1H, $^3J=6.7$ Hz, H1'(G)); 6.07 (t, 1H, $^3J=6.8$ Hz, H1'(C)); 5.49 (d, 1H, $^3J=4.1$ Hz, OH-3'); 4.95 (m, 1H, H3'(C)); 4.37 (m, 1H, H3'(G)); 4.17 (m, 1H, H5 $_{\alpha}$ '(G)); 4.06 (m, 2H, H4'(C), H5 $_{\beta}$ '(G)); 3.96 (m, 1H, H4'(G)); 3.75 (s, 6H, O-CH₃); 3.28 (s, 1H, -CH₂-P); 3.19 (s, 1H, -CH₂-P); 3.16 (m, 2H, H5'(C)); 2.74 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.67 (m, 2H, H2 $_{\alpha}$ '(C), H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.38 (m, 2H, H2 $_{\beta}$ '(C), H2 $_{\beta}$ '(G)); 1.04 (m, 12H, -CH₃ ⁱBu)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)
27.12

ESI-MS(+): berechnet: 1112.1 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
gefunden: 1111.9 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 143Rp

Ausbeute: 83 mg (48%)

DC: $R_f = 0,14$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, (d_6) -DMSO)
11.97 (s, 1H, N-H); 11.54 (s, 1H, N-H); 10.87 (s, 1H, N-H); 8.10 (s, 1H, H-8(G)); 8.02 (d, 1H, $^3J=7.4$ Hz, H-6(C)); 7.35-7.17 (m, 11H, arom. H); 7.06 (d, 1H, $^3J=7.5$ Hz, H-5(C)); 6.87 (m, 4H, arom. H); 6.26 (t, 1H, $^3J=6.5$ Hz, H1'(G)); 6.09 (t, 1H, $^3J=6.2$ Hz, H1'(C)); 5.57 (d, 1H, $^3J=4.1$ Hz, OH-3'); 4.95 (m, 1H, H3'(C)); 4.36 (m, 1H, H3'(G)); 4.20 (m, 1H, H4'(C)); 4.11 (m, 2H, H5'(G)); 3.97 (m, 1H, H4'(G)); 3.71 (s, 6H, O-CH₃); 3.29 (m, 2H, -CH₂-P); 3.21 (m, 2H, H5'(C)); 2.69 (m, 2H, C-H ⁱBu); 2.56 (m, 2H, H2 $_{\alpha}$ '(C), H2 $_{\alpha}$ '(G)); 2.27 (m, 2H, H2 $_{\beta}$ '(C), H2 $_{\beta}$ '(G)); 1.08 (m, 12H, -CH₃ ⁱBu)

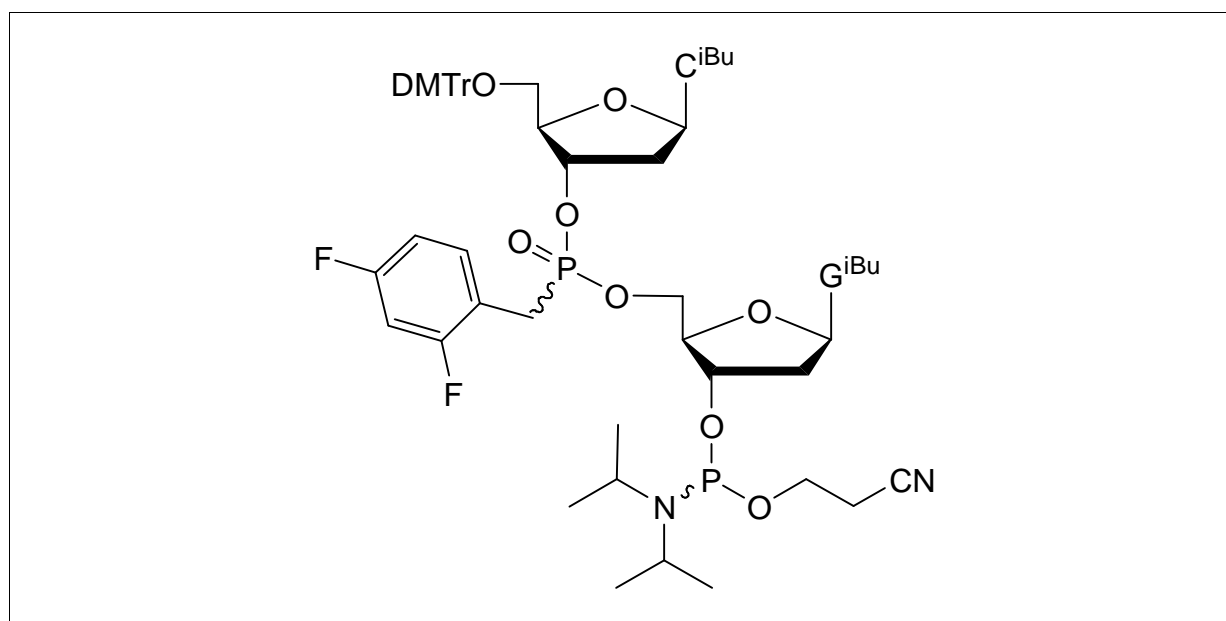
^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, (d_6) -DMSO)

27.66

ESI-MS(+): berechnet: 1112.1 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden: 1111.8 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

144Rp und 144Sp [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[3'-O-((2-cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphoramidit)- N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 2,4-difluorbenzylphosphonat



$\text{C}_{64}\text{H}_{78}\text{F}_2\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{P}_2$ [1311,31]

120 mg des Rp oder Sp konfigurierten [5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyryl-2'-desoxycytidin-3-yl]-[N^2 -isobutyryl-2'-desoxyguanosin-5-yl] 2,4-difluorbenzylphosphonat **143** (0,11 mmol) wurden in 10 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst und unter Argonatmosphäre mit 0,10 ml DIPEA (0,58 mmol) versetzt. Zu dieser Lösung wurden 46 μl Phosphorigsäuremono-(2-cyanethylester)-diisopropylamid-chlorid (0,2 mmol) getropft und 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 10 ml abs. CH_2Cl_2 verdünnt, auf 0°C gekühlt und mit 5 ml 5%iger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Die org. Phase wurde

abgetrennt und die wässrige Phase mit 20 ml Essigester reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und die Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert (Laufmittel: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TEA}$ 97:2:1)

Sp-konfiguriertes Diastereoisomer 144Sp

Ausbeute: 87 mg (61%)

DC: $R_f = 0,21$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
12.15 (s, 2H, N-H); 10.49 (s, 2H, N-H); 10.41 (s, 2H, N-H); 8.54 (m, 2H, H-8(G)); 7.90 (m, 2H, H-6(C)); 7.30-7.11 (m, 24H, arom. H, H-5(C)); 6.79 (m, 8H, arom. H); 6.12 (m, 4H, H1'(G), H1'(C)); 4.97 (m, 2H, H3'(C)); 4.57 (m, 2H, H3'(G)); 4.40-4.25 (m, 6H, H5'(G), H4'(C)); 4.11 (m, 2H, H4'(G)); 3.79 (s, 12H, O- CH_3); 3.68 (m, 4H, CH ^iPr); 3.27-3.06 (m, 12H, $-\text{CH}_2\text{-P}$, H5'(C), O- $\text{CH}_2\text{-}$); 2.81-2.55 (m, 12H, C-H ^iBu , H2 $_{\alpha}'$ (C), H2 $_{\alpha}'$ (G), $-\text{CH}_2\text{-CN}$); 2.39-2.21 (m, 4H, H2 $_{\beta}'$ (C), H2 $_{\beta}'$ (G)); 1.36-1.00 (m, 48H, $-\text{CH}_3$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
150.31, 150.12 (Phosphoramidit); 26.56, 26.49 (2,4-Difluorbenzylphosphonat)

ESI-MS(+): berechnet: 1312.3 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$
Gefunden: 1312.0 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$

Rp-konfiguriertes Diastereoisomer 144Rp

Ausbeute: 111 mg (48%)

DC: $R_f = 0,20$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
12.40 (2s, 2H, N-H); 10.78 (2s, 2H, N-H); 10.63 (b, 2H, N-H); 8.24 (m, 2H, H-8(G)); 7.96 (m, 2H, H-6(C)); 7.31-7.22 (m, 24H, arom. H, H-5(C)); 6.81 (m, 8H, arom. H); 6.13 (m, 4H, H1'(G), H1'(C)); 5.07 (m, 2H, H3'(C)); 4.60 (m, 2H, H3'(G)); 4.36-4.12 (m, 6H, H5'(G), H4'(C), H4'(G)); 3.78 (s, 12H,

O-CH₃); 3.61 (m, 4H, CHⁱPr); 3.26-3.00 (m, 12H, -CH₂-P, H5'(C), O-CH₂-); 2.79-2.53 (m, 12H, C-HⁱBu, H2_α'(C), H2_α'(G), -CH₂-CN); 2.37-2.09 (m, 4H, H2_β'(C), H2_β'(G)); 1.30-1.04 (m, 48H, -CH₃)

³¹P-NMR: (162 MHz, CDCl₃)
150.46, 150.25 (Phosphoramidit); 27.87, 27.49 (2,4-Difluorbenzyl-phosphonat)

ESI-MS(+): berechnet: 1312.3 m/z [M+H]⁺
gefunden: 1311.9 m/z [M+H]⁺

12.3 Oligonucleotide

12.3.1 Eingesetzte Pufferlösungen

Für RP-HPLC-Trennung

0,1 M TEAA-Puffer: 140 ml (1,0 mol) Triethylamin wurden unter Eiskühlung mit 600 ml deionisiertem Wasser und 58 ml Essigsäure versetzt. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt, der pH-Wert überprüft und mit Essigsäure oder Triethylamin auf pH 7,0 eingestellt. Die so erhaltene Stammlösung wurde vor Gebrauch 1:10 verdünnt und der pH-Wert überprüft.

Für die Anionenaustausch-HPLC

Puffer A: DEPC-Wasser wurde mit LiOH auf pH 8,0 eingestellt.

Puffer B: Es wurden 42,39 g LiCl (1,0 mol) in 1000 ml DEPC-Wasser gelöst und mit LiOH oder HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven, CD- und Fluoreszenzspektren

Phosphatpuffer: 100 ml des Natriumphosphatpuffers wurden durch Lösen von 207 mg *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (0,577 mmol), 66 mg Natriumdihydrogenphosphat (0,423 mmol) und 818 mg Natriumchlorid (14,0 mmol) in 100 ml deionisiertem Wasser (im Falle von RNA-Messungen in DEPC-Wasser) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

Für die Bestimmung der Nucleasestabilität

246 mg Natriumacetat (3 mM) und 47 µl Essigsäure (0,08 mmol) wurden mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 5,3 eingestellt.

DEPC-Wasser

1 ml Diethylpyrocarbonat wurde zu 1000 ml deionisiertem Wasser gegeben und für 12h stehen gelassen. Die Lösung wurde danach 30 min bei 121°C autoklaviert.

12.3.2 Synthese der Oligonucleotide

DNA-Synthese

Die DNA-Synthesen wurden an einem DNA/RNA-Synthesizer der Firma PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) im 1,0 μmol Maßstab synthetisiert. Es wurden CPG-Träger (500 Å oder 1000 Å) von den Firmen Proligo bzw. PE Biosystems, die das erste Nucleosid tragen, eingesetzt. Die DNA-Phosphoramiditbausteine (Proligo), wie auch die modifizierten Phosphoramidite, wurden in Konzentrationen von 100 mM in abs. Acetonitril (BIOSOLVE LTD., water: 10 ppm, Cat. Nr.: 01205831) eingesetzt. Für alle modifizierten Phosphoramidite wurde die Kupplungszeit von 30 auf 300 s verlängert. Die Effizienz der Kupplungsschritte wurden über einen „Trityl-Monitor“ (Abspaltung der DMTr-Gruppe und der damit verbundenen Absorptionsmessung bei 498 nm) quantifiziert. Alle Synthesen wurden unter Verbleib der endständigen Dimethoxytritylgruppe (DMTr-on) durchgeführt. Der Einbau der modifizierten Phosphoramidit-Dimere **140Rp**, **140Sp**, **144Rp** und **144Sp** erfolgte in der oben beschriebenen Vorgehensweise.

RNA-Synthese

Die RNA-Synthesen wurden ebenfalls an einem DNA/RNA-Synthesizer der Firma PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) im 1,0 μmol Maßstab unter Standardbedingungen synthetisiert. Die Synthesen wurden unter Abspaltung der endständigen Dimethoxytritylgruppe (DMTr-off) durchgeführt.

12.3.3 Entschützung/Aufreinigung/Diastereomerentrennung

DNA-Oligonucleotide

Entschützung

Die Abspaltungsmethoden der Oligonucleotide vom CPG-Trägermaterial und der Entschützung waren abhängig von der Art, Anzahl und Position der Modifikationen. Hierzu wurde die Synthesesäule aufgebrochen, das Trägermaterial in ein verschließbares Glasgefäß überführt und mit dem Abspaltungsreagenz versetzt. Folgende Varianten wurden eingesetzt:

- a) Zugabe von 0,7 ml konz. NH_3 ; Abspaltung innerhalb von 3h bei 60°C
- b) Zugabe von 0,7 ml konz. NH_3 ; Abspaltung innerhalb von 24h bei Raumtemperatur
- c) Zugabe von 0,4 ml EDA-Mix (Ethylendiamin/Acetonitril/Ethanol/Wasser 50:24:24:2); Abspaltung innerhalb von 3h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Zudem wurde die Lösung vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt. Anschließend wurde die Abspaltungsmischung bei 0°C mit 1,5 ml deionisiertes Wasser verdünnt und mit 40%iger Essigsäure langsam neutralisiert.

Variante a) kam bei allen unmodifizierten Oligonucleotiden zum Einsatz. Die Variante c) wurde bei basenlabilen Rückgratmodifikationen eingesetzt. Dazu zählten die methyl-, 1-methylnaphthyl- und 2,4-difluorbenzylmodifizierten Oligonucleotide **S08**, **S12**, **S18**, **S25-S27**, **S31-S33** und **S56**. Die restlichen Oligonucleotide wurden mittels der Methode b) entschützt und vom Trägermaterial abgespalten.

Nach der Abspaltung wurde das Trägermaterial mittels Filtration (0,45 μm ; Roth Nr. 0081) abgetrennt.

Aufreinigung

Die entschützten Roholigonucleotide wurden mittels semipräparativer RP-HPLC aufgereinigt. Hierzu wurde eine DMTr-spezifische POROS-R3 Säule der Firma PerSeptive Biosystems eingesetzt. Die nach der Filtration erhaltenen Lösungen konnten dabei direkt auf die Säule aufgegeben werden. Es wurde jeweils ein linearer Gradient von 0-40% Acetonitril in TEAA-Puffer (pH 7,0) in 10 Minuten bei einer Flussrate von 5 ml/min verwendet. Eine Ausnahme stellten die 17mer Antisense-

Oligonucleotide dar, die mit einem Gradienten von 0-60% Acetonitril in 10 min aufgereinigt wurden. Die Detektion erfolgte jeweils bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Anschließend wurden die Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur an einer SpeedVac Anlage abdestilliert.

Die DMTr-Schutzgruppe wurde bei Raumtemperatur durch Zugabe von 500 μ l 80%iger Essigsäure abgespalten. Nach 30 minütiger Inkubation wurde die Essigsäure im Vakuum abgezogen (SpeedVac). Die Abtrennung der abgespaltenen DMTr-Gruppe erfolgte mittels Fällung. Dafür wurde das Oligonucleotid in 1 ml 1M NaCl-Lösung bzw. in 1 ml 10 M Ammoniumacetat-Lösung gelöst und durch Zugabe von 3 ml Ethanol gefällt. Die Fällung wurde durch zweistündiges Kühlen auf -80°C vervollständigt. Das ausgefallene Produkt wurde in einer Kühlzentrifuge bei 12500 rpm innerhalb von 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert.

Die 17mer Antisense-Oligonucleotide wurden anschließend einem weiteren Aufreinigungsschritt unterworfen. Dabei wurde das Pellet in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und über RP-HPLC an einer LiChrospher RP 18 Säule (5 μ m) der Firma Merck chromatographiert. Es wurde ein Gradient von 0-60% Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) in 30 min bei einer Flussrate von 3 ml/min verwendet. Die Lösungsmittel wurden anschließend im Vakuum (SpeedVac) abdestilliert.

Diastereoisomerentrennung

Die Diastereoisomerentrennung mono-modifizierter Oligonucleotide erfolgte ebenfalls mittels RP-HPLC an einer analytischen Purospher[®] STAR RP-18e (5 μ m) Säule der Firma Merck.

Dazu wurden die von der Fällung erhaltenen Pellets in 500 μ l bidest. Wasser gelöst und auf die HPLC-Säule gegeben. Die Gradienten aus 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) und Acetonitril variierten bei einer konstanten Flussrate von 1,0 ml/min in Abhängigkeit der Art und der Position der Modifikation (siehe Tabelle 12.2). Tabelle 12.1 zeigt beispielhaft ein vollständiges Gradientenprogramm für die Isomerentrennung des Oligonucleotids **S34**.

Tabelle 12.1: Exemplarisches HPLC-Gradientenprogramm zur Trennung der Diastereoisomeren des Oligonucleotids **S34**

Zeit [min]	[%] TEAA- Puffer	[%] Acetonitril	Fluss [ml/min]
0	95	5	1,0
2	95	5	1,0
40	75	25	1,0
40,1	0	100	1,0
45	0	100	1,0
45,1	95	5	1,0
50	95	5	1,0

RNA Oligonucleotide

Enschützung

Die Oligonucleotide wurden bei 55°C über Nacht durch Behandlung mit konz. Ammoniak/Methanol 3:1 (2,0 ml) entschützt und vom Träger abgespalten. Das Trägermaterial wurde mittels Sterilfiltration (Nalgene 0,2 µm Spritzenfilter mit Zelluloseacetatmembran) abgetrennt und das Filtrat in einem SpeedVac Konzentrator bis zur Trockene eingengt. Die 2'-TBDMS-Schutzgruppen wurden durch Zugabe von 1 ml Triethylamin-Trihydrofluorid innerhalb von 24 h bei RT abgespalten. Zu dieser Lösung wurden 3 ml *n*-Butanol gegeben, wodurch die RNA innerhalb von 3h bei –20°C ausfiel. Das ausgefallene Produkt wurde in einer Kühlzentrifuge bei 12500 rpm innerhalb von 10 min pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert.

Aufreinigung

Das Wasser, das für die Pufferlösungen für die RNA-Aufreinigung eingesetzt wurde, war immer mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurde eine 0,1%ige DEPC-Lösung angesetzt und über Nacht bei RT stehen gelassen. Die vorbehandelte Lösung wurde danach 30 min bei 121°C autoklaviert. Das Wasser wurde anschließend mit LiOH bzw. HCl auf pH 8,0 eingestellt.

Das nach der Fällung erhaltene Pellet wurde in 500 µl Wasser gelöst und mittels Anionenaustausch-HPLC [Dionex NucleoPAC™ PA 100 Säule (250 × 9 mm)] an einer

JASCO HPLC-Anlage aufgereinigt. Löste sich das Oligonucleotid nicht vollständig in DEPC-Wasser, wurden einige Tropfen 1-Methyl-2-pyrrolidinon zugegeben. Es wurden lineare Gradienten von 0-60% Puffer B in A innerhalb von 40 min bei einer Flussrate von 5,0 ml/min verwendet (Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0), Puffer B: 1,0 M LiCl (pH 8,0)). Die UV-Detektion erfolgte ebenfalls bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach der Aufreinigung wurden die Lösungsmittel an einer SpeedVac-Anlage entfernt, das Oligonucleotid in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und über eine Sephadex PD 10 Säule mit G25 Material entsalzt.

Tab. 12.2 Übersicht der berechneten sowie durch MALDI-TOF-MS gemessenen Molekülmassen der synthetisierten Oligonucleotide. RP-HPLC-Gradienten zur Trennung der einfach modifizierten diastereoisomeren Oligonucleotide: Puffer A: 0,1M TEAA (pH 7,0); B: Acetonitril.

Strang	Sequenz	RP-HPLC-Isomeren-trennung	Sp/Rp	Ber. Masse [Da]	Gef. Masse [Da]
S01	5'-d(GCC GCG)	---	---	1793,2	1792,2
S02	5'-d(CGC GGC)	---	---	1793,2	1790,7
S03	5'-d(GCB ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1868,3	1873,9
			Sp	1868,3	1872,9
S04	5'-d(GCD ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1882,4	1881,4
			Sp	1882,4	1886,2
S05	5'-d(GCE ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1896,4	1891,9
			Sp	1896,4	1891,9
S06	5'-d(GCF ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1910,4	1916,9
			Sp	1910,4	1914,6
S07	5'-d(GCH ^C •GCG)	0-30% B in 40'	Rp	1924,4	1923,5
			Sp	1924,4	1921,8
S08	5'-d(GCI ^C •GCG)	0-25% B in 40'	Rp	1918,4	1919,8
			Sp	1918,4	1918,4
S09	5'-d(GCJ ^C •GCG)	0-25% B in 50'	Rp	1946,4	1946,1
			Sp	1946,4	1942,7

S10	5'-d(GCK ^C •GCG)	0-27% B in 50'	Rp	1996,5	1991,5
			Sp	1996,5	1995,1
S11	5'-d(GCL ^C •GCG)	0-25% B in 35'	Rp	1920,4	1919,0
			Sp	1920,4	1920,2
S12/1	5'-d(GC144RpCG)	---	Rp	1904,3	1903,0
S12/2	5'-d(GC144SpCG)	---	Sp	1904,3	1907,1
S13	5'-d(GCN ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1886,3	1884,6
			Sp	1886,3	1885,9
S14	5'-d(GCO ^C •GCG)	0-25% B in 30'	Rp	1882,3	1883,6
			Sp	1882,3	1881,5
S15	5'-d(GCP ^C •GCG)	0-30% B in 30'	Rp	1898,3	1896,7
			Sp	1898,3	1897,0
S16	5'-d(GCQ ^C •GCG)	5-35% B in 30'	Rp	1924,4	1926,2
			Sp	1924,4	1926,2
S17	5'-d(GCR ^C •GCG)	0-30% B in 40'	Rp	1928,4	1928,9
			Sp	1928,4	1927,4
S18	5'-d(GCS ^C •GCG)	0-25% B in 40'	Rp	1792,2	1793,9
			Sp	1792,2	1790,9
S19	5'-d(GCCp _s GCG)	0-18% B in 40'	Rp	1809,3	1807,0
			Sp	1809,3	1809,9
S20	5'-d(CAG GTC AAT CAT)	---	---	3629,4	3629,2
S21	5'-d(ATG ATT GAC CTG)	---	---	3660,5	3662,2
S22	5'-d(CAG GTB ^C •AAT CAT)	5-22% B in 40'	Rp	3704,5	3705,5
			Sp	3704,5	3707,3
S23	5'-d(CAG GTC AAT B ^C •AT)	5-18% B in 40'	Rp	3704,5	3704,3
			Sp	3704,5	3701,4
S24	5'-d(B ^C •AG GTC AAT CAT)	5-22% B in 40'	Rp	3704,5	3702,9
			Sp	3704,5	3704,4
S25	5'-d(CAG GTM ^C •AAT CAT)	5-30% B in 30'	Rp	3740,5	3738,5
			Sp	3740,5	3740,6

S26	5'-d(CAG GTC AAT M^C •AT)	5-16% B in 40'	Rp	3740,5	3740,0
			Sp	3740,5	3740,8
S27	5'-d(M^C •AG GTC AAT CAT)	5-30% B in 40'	Rp	3740,5	3739,5
			Sp	3740,5	3741,8
S28	5'-d(CAG GT E^C •AAT CAT)	5-30% B in 40'	Rp	3732,6	3740,6
			Sp	3732,6	3732,6
S29	5'-d(CAG GTC AAT E^C •AT)	5-17% B in 40'	Rp	3732,6	3731,2
			Sp	3732,6	3731,0
S30	5'-d(E^C •AG GTC AAT CAT)	0-30% B in 30'	Rp	3732,6	3733,7
			Sp	3732,6	3731,4
S31	5'-d(CAG GT I^C •AAT CAT)	5-25% B in 40'	Rp	3754,6	3761,2
			Sp	3754,6	3755,8
S32	5'-d(CAG GTC AAT I^C •AT)	5-17% B in 50'	Rp	3754,6	3754,9
			Sp	3754,6	3752,8
S33	5'-d(I^C •AG GTC AAT CAT)	5-20% B in 40'	Rp	3754,6	3755,7
			Sp	3754,6	3755,2
S34	5'-d(CAG GT J^C •AAT CAT)	5-25% B in 40'	Rp	3782,7	3781,9
			Sp	3782,7	3781,4
S35	5'-d(CAG GTC AAT J^C •AT)	7-20% B in 40'	Rp	3782,7	3781,6
			Sp	3782,7	3781,2
S36	5'-d(J^C •AG GTC AAT CAT)	5-25% B in 40'	Rp	3782,7	3781,6
			Sp	3782,7	3781,6
S37	5'-d(CAG GT K^C •AAT CAT)	10-30% B in 45'	Rp	3832,7	3840,0
			Sp	3832,7	3832,6
S38	5'-d(CAG GTC AAT K^C •AT)	10-18% B in 45'	Rp	3832,7	3836,4
			Sp	3832,7	3840,8
S39	5'-d(K^C •AG GTC AAT CAT)	10-25% B in 45'	Rp	3832,7	3833,1
			Sp	3832,7	3832,2
S40	5'-d(CGC GCG)	---	---	1793,2	1798,9
S41	5'-d(CGB B^C •GCG)	5-15% B in 40'	Rp	1868,3	1869,8
			Sp	1868,3	1871,3

S42	5'-d(CGD ^C •GCG)	5-18% B in 40'	Rp	1882,4	1885,2
			Sp	1882,4	1884,1
S43	5'-d(CGE ^C •GCG)	5-20% B in 45'	Rp	1896,4	1998,5
			Sp	1896,4	1897,3
S43/1	5'-d(CG140RpCG)	---	Rp	1896,4	1895,3
S43/2	5'-d(CG140SpCG)	---	Sp	1896,4	1896,8
S44	5'-d(CGH ^C •GCG)	5-25% B in 50'	Rp	1924,4	1927,9
			Sp	1924,4	1923,6
S45	5'-d(CGT CAC GAC AT)	---	---	3301,2	3300,5
S46	5'-d(ATG TCG GAC G)	---	---	3068,1	3067,0
S47	5'-d(CGT CAH ^C •GAC AT)	0-30% B in 40'	Rp	3432,4	3433,4
			Sp	3432,4	3452,6
S48	5'-d(CGT CCG ACA T)	---	---	2988,0	2987,4
S49	5'-d(CGT CH ^C •G ACA T)	0-30% B in 40'	Rp	3119,2	3119,6
			Sp	3119,2	3118,0

Tab. 12.3 Übersicht der berechneten sowie durch MALDI-TOF gemessenen Massen.

Strang	Sequenz	Ber. Masse [Da]	Gef. Masse [Da]
S50	5'-d(TGG TGC ACG GTC TAC GA)	5226,5	5227,2
S51	5'-d(TCG TAG ACC GTG CAC CA)	5155,4	5150,7
S52	5'-r(UCG UAG ACC GUG CAC CA)	5385,3	5400,1
S53	5'-d(B ^T •B ^G •B ^G •TGC ACG GTC TB ^A •B ^C •B ^G •A)	5677,3	5676,4
S54	5'-d(D ^T •D ^G •D ^G •TGC ACG GTC TD ^A •D ^C •D ^G •A)	5761,5	5766,8
S55	5'-d(F ^T •F ^G •F ^G •TGC ACG GTC TF ^A •F ^C •F ^G •A)	5929,8	5930,0
S56	5'-d(M ^T •M ^G •M ^G •TGC ACG GTC TM ^A •M ^C •M ^G •A)	5893,2	5887,2
S57	5'-d(Tp _s Gp _s Gp _s TGC ACG GTC TAp _s Cp _s Gp _s A)	5322,5	5328,2
S58	5'-r(GAGGUCUCGUAGACCGUGCACCAUGAG CAC)	9626,4	9650,3
S59	5'-r(CUC AUG GUG CAC GGU CUA CGA TT)	7272,4	7296,3
S60	5'-r(UCG UAG ACC GUG CAC CAU GAG TT)	7295,4	7317,4
S61	5'-r(CUG AUG CUG CAC CGU GUA CGA TT)	7272,4	7295,7

Quantifizierung der Menge an Oligonucleotid

OD-Bestimmung

Die aufgereinigten Oligonucleotide wurde in 1,0 ml deionisiertem Wasser gelöst (im Falle von RNA in DEPC-Wasser). 10 µl der jeweiligen Lösung wurden entnommen und in einer 10 mm Quarzküvette zu 990 µl deionisiertem Wasser gegeben. Die Extinktion (Optische Dichte: OD) wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und der ermittelte Wert mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert. Aus den so ermittelten OD₂₆₀-Einheiten lies sich mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ die Konzentration bestimmen.

Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Der molare Extinktionskoeffizient von 2'-Desoxynucleotiden kann nach Eckstein (Eckstein, 1991) aus der Summe der bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nucleotide abgeschätzt werden. Näherungsweise gilt folgender Zusammenhang:

$$[12-1] \quad \epsilon = 88,8 * nT + 7,3 * nC + 11,7 * nG + 15,4 * nA) * 0,9 [1000 \text{ cm}^2 * \text{mol}^{-1}]$$

Hierbei gibt n die jeweilige Häufigkeit der Basen im Oligonucleotid wieder und der Faktor 0,9 trägt der verringerten UV-Absorption aufgrund des Einflusses der Basenstapelungswechselwirkungen Rechnung. Eine exaktere Methode zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten berücksichtigt die Wechselwirkung der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn (Puglisi, 1989; Gray, 1995). Diese bewirkt, dass der Extinktionskoeffizient eines Dinucleotids nicht der Summe der Einzelnucleotide entspricht. Die Zahlenwerte für die DNA- und RNA-Oligonucleotide sind in Tabelle 12.4 wiedergegeben. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus zweimal der Summe aller im Oligonucleotid vorkommenden Dimere minus der Summe aller Mononucleotide, ohne die beiden endständigen Nucleotide (siehe Gleichung 12-2).

$$[12-2] \quad \epsilon(\dots ACGU \dots) = 2 * [\epsilon(AC) + \epsilon(CG) + \epsilon(GU) + \dots] - [\epsilon(C) + \epsilon(G) + \epsilon(U) + \dots]$$

Die Extinktionskoeffizienten der Rückgrat modifizierten Dimere wurden nicht bestimmt. In diesen Fällen wurde mit den Werten der natürlichen Nucleoside gerechnet. Die Konzentration der Oligonucleotid-Lösung kann somit aus dem Lambert-Beerschen-

Gesetz mittels der gemessenen OD-Zahl, der Schichtdicke d und des berechneten Extinktionskoeffizienten ε berechnet werden [12-3].

$$[12-3] \quad c = OD_{260} / \varepsilon \cdot d$$

Tab. 12.4: Extinktionskoeffizienten für monomere und dimere Nucleotide bei 260 nm, 25°C, pH= 7,0 und einer Ionenstärke von 0,1 M.

Baustein	DNA	RNA	Baustein	DNA	RNA
A	15,34	15,34	CG	9,39	9,39
C	7,60	7,60	CT/CU	7,66	8,37
G	12,16	12,16	GA	12,92	12,92
T/U	8,70	10,21	GC	9,19	9,19
AA	13,65	13,65	GG	11,43	11,43
AC	10,67	10,67	GT/TU	10,22	10,96
AG	12,79	12,79	TA/UA	11,78	12,52
AT/AU	11,42	12,14	TC/UC	8,15	8,90
CA	10,67	10,67	TH/UG	9,70	10,40
CC	7,52	7,52	TT/UU	8,61	10,11

12.3.4 Analytik

Massenspektrometrie: MALDI-TOF-MS

Diese Methode wurde fast zeitgleich von Karas und Hillenkamp sowie Tanaka eingeführt (Karas, 1988; Tanaka, 1988). Bei dieser Methode wird das Oligonucleotid mit einer Matrix, die im 10^4 fachen Überschuss vorliegt, kokristallisiert und anschließend mit einem IR- oder UV-Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers beschossen. Häufig verwendete Matrixsubstanzen für Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm sind 2,4,6-Trihydroxyacetophenon oder 3-Hydroxypicolinsäure. Als gepulste Desorptions-/ionisationsmethode wird MALDI häufig mit einem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF: *time of flight*) kombiniert, in dem alle Ionen in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt und gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitgleich aufgetrennt werden. Diese Methode ist gegenüber der ESI-Massenspektrometrie

weniger empfindlich gegenüber angelagerten Salzen. Die Oligonucleotide wurden aber trotzdem über eine Sephadex PD 10 Säule mit G25 Material entsalzt, wodurch exaktere Spektren erhalten wurden.

Die in dieser Arbeit aufgenommenen Spektren wurden mit matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI) auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) der Firma Fisons entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Reinheit der 17mer Antisense-Oligonucleotide wurde ferner mittels PAGE überprüft. Hierfür wurden folgend Lösungen/Puffer angesetzt:

- Boratpuffer (TBE): 54,5 g Tris, 27,5 g Borsäure und 3,7 g EDTA-Dinatriumsalz wurden in einem Liter bidest. Wasser gelöst. Zur Verwendung als Laufpuffer (1×TBE) wurde die Lösung 1:5 verdünnt.
- 40% Acrylamid-Stammlösung: 400 g Acrylamid und 20 g *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid wurden in 580 ml bidest. Wasser gelöst.

Für die analytischen Gele wurden 15 ml der 40%igen Acrylamid-Stammlösung, 7,5 ml 5×TBE-Puffer, 15,7 g Harnstoff und 4 ml Wasser zusammengegeben. Mit dieser Zusammensetzung erhielt man 15%ige PAA-Gele. Nach vollständigem Lösen des Harnstoffes wurde die Polymerisation durch Zugabe von 17,5 µl TEMED und 230 µl einer 10%igen, wässrigen APS-Lösung gestartet. Die Lösung wurde sofort blasenfrei zwischen zwei 10×10 cm große, silanisierte Glasplatten gegossen. Die Proben (je 0,05 OD) wurden lyophilisiert, in 10 µl einer Wasser/Formamid Lösung (1:1) aufgenommen und in die Taschen des in die Elektrophoreseapparatur eingespannten Gels aufgetragen. Zur Markierung dienten 2 µl einer mit 0,1% (w/v) Bromphenolblau (ca. 15 nt) und 0,1% (w/v) Xylencyanol (ca. 60 nt) gefärbten Formamidlösung in einer separaten Tasche. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V mit 1×TBE als Laufpuffer. Nach vier Stunden, als der Farbstoff Bromphenolblau nahezu das untere Ende des Gels erreicht hatte, wurde der Strom abgeschaltet, das Gel von den Platten entfernt und die Banden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Dabei wurde das Gel für 10 min in einer Lösung von 10g Trichloressigsäure in 40 ml Wasser geschwenkt und anschließend zweimal für je 5 min mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit einer 0,1%igen Silbernitratlösung für ca. 20 min behandelt, mit Wasser das Silbernitrat ausgewaschen und mit einer Na₂CO₃-Lösung (3,75 g Na₂CO₃, 64 µl 35% Formaldehyd in 125 ml Wasser) bis zur gewünschten

Schwarzfärbung der Banden entwickelt. Die Färbung wurde durch Einlegen des Gels in 1%ige Essigsäure gestoppt. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wurde das Gel in Folie eingewickelt und gescannt.

12.3.5 Aufnahme von UV-Schmelzkurven

Die UV-Schmelzkurven wurden an einem UV/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Als Puffer diente ein Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 140 mM Natriumchlorid und 10 mM Phosphat (vgl. Kap. 12.2.1). Damit entsprach die Salzkonzentration des Puffers ungefähr der des Blutserums.

Vor der Messung wurden für alle Proben die Extinktionskoeffizienten rechnerisch bestimmt. Mit Hilfe der gemessenen OD_{260} Menge der Stammlösung konnte nun die einzupipettierende Menge der zu hybridisierenden Einzelstränge errechnet werden. Es wurde jeweils eine Gesamtmenge von ca. $1,0 OD_{260}$ eingesetzt, was einer Konzentration von $19 \mu\text{M}$ (Hexamere), $8 \mu\text{M}$ (Dodecamere) und $4 \mu\text{M}$ (17mere) entsprach. Für die Messung wurde eine Küvette mit 1,0 ml Puffer befüllt und in den Referenzstrahl gestellt sowie eine zweite, die mit $1,0-X$ ml Puffer ($X = \mu\text{l}$ der einzupipettierenden Oligonucleotidlösungen) befüllt war in den Messstrahlengang eingebracht.

Vor Beginn der Messung wurden die Küvetten mit Teflon-Deckeln fest verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels während der Messung zu verhindern. Vor der T_m -Wert Messung wurden die Lösungen auf 80°C erhitzt (Denaturierung) und mit einer Kühlrate von $3^\circ\text{C}/\text{min}$ auf die Starttemperatur der Messung (5°C bzw. 10°C) abgekühlt (Renaturierung). Die folgende Aufnahme der Schmelzkurven bei 260 nm (12mere und 17mere) bzw. 274 nm (C-G Hexamere) wurde mit einer Heizrate von $0,5^\circ\text{C}$ durchgeführt. Alle 30 Sekunden wurde ein Datenpunkt registriert. Als Temperatur wurde die Temperatur des Probenblocks des Spektrometers angegeben was nach Angaben von Varian (Varian, 1998) ausreichend exakt ist. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Für alle Messungen unterhalb von 20°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um die Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden. Die Bestimmung der Schmelzpunkte aus den experimentell ermittelten Schmelzkurven erfolgte nach literaturbekannten Vorgehensweisen (Marky, 1987; Puglisi, 1989; Schweitzer, 1998; Parsch, 1999).

12.3.6 Bestimmung der Stabilität gegenüber Nucleasen

4 μM der Antisense-Oligonucleotide (0,5 OD) wurden in einer Quarzglasküvette zu Natriumacetatpuffer (30 mM, pH 5,3) pipettiert, so dass ein Gesamtvolumen von 1000 μl resultierte. Zu dieser Lösung wurde 1 μl Nuclease P1 (300 Einheiten/ml Lösung) pipettiert, rasch durchmischt und umgehend in den Strahlengang des UV-Spektralphotometers gegeben und die Messung gestartet.

12.3.7 RP-HPLC Retentionszeiten

Die Retentionszeiten der einfach modifizierten Oligonucleotide (isomerenrein) wie auch der 17mer Antisense-Oligonucleotide wurde mittels einer Merck HPLC-Anlage an einer analytischen Purospher® STAR RP-18e (5 μm) Säule der Firma Merck ermittelt. Es wurden jeweils 0,2-0,3 OD₂₆₀ in 20 μl bidest. Wasser gelöst und auf die Säule gegeben. Für die mono-modifizierten Hexamere wurde ein linearer Gradient von 0-30% Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) in 40 min bei einem Fluss von 1,0 ml/min verwendet. Für die 17mer Oligonucleotide kam ein Gradient von 0-60% Acetonitril in 0,1 M TEAA-Puffer (pH 7,0) in 30 min bei einem Fluss von 1,0 ml/min zum Einsatz. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

12.3.8 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden auf einem Jasco J-710 Spectropolarimeter aufgenommen, das mit einem thermostatisierten Küvettenhalter (PTC-348WI Peltier-Temperatur-Kontrollthermostat) ausgerüstet war. Für die Messungen wurden 1000 μl Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke verwendet. Die maximale Extinktion (OD₂₆₀) der Proben lag bei etwa 1,0. In der Regel wurden die bereits denaturierten/natürlichen Proben der UV-Spektroskopie (T_m -Wert Bestimmung) verwendet. Zur Messung der wellenlängenabhängigen Spektren, die bei 5°C durchgeführt wurden, wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 350-200 nm akkumuliert. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: resolution 0,1 nm, scan speed 50 nm/min, response 1 sec und band width

1,0 nm. Von den aufgenommenen Spektren wurde immer das bei gleicher Temperatur registrierte Spektrum des Puffers subtrahiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kurven per Software (Jasco: Standard Analysis) geglättet.

12.3.9 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Messungen wurden an einem Hitachi F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer durchgeführt. Es wurden 0,2 μM modifiziertes Oligonucleotid (ca. 0,025 OD_{260}) in 1,0 ml Phosphatpuffer (pH 7,0) einpipettiert und das Fluoreszenzspektrum bei einer Einstrahlwellenlänge (Excitation) von 255 nm im Bereich von 500-320 nm bei RT aufgenommen. In die Küvette wurde im Anschluss ebenfalls 0,2 μM unmodifiziertes Oligonucleotid (Gegenstrang) einpipettiert und wie unter Kap. 12.3.5 beschrieben denaturiert/renaturiert. Anschließend wurde unter denselben Messbedingungen wie bei der Einzelstrangmessung das Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

13

Literatur

Adams, M.D. et al.; The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **2000**, 287, 2185-2195.

Agrawal, S.; Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1489, 53-68.

Agrawal, S.; Zhao, Q.; Antisense therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 519-528.

Agrawal, S.; Temsamani, J.; Galbraith, W.; Tang, J.Y.; Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, 28, 7-16.

Agrawal, S.; Goodchild, J.; Oligodeoxynucleoside methylphosphonates: Synthesis and enzymatic degradation. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28(31), 3539-3542.

Agrawal, K.L.; Riftina, F.; Synthesis and enzymatic properties of deoxyribonucleotides containing methyl and phenylphosphate linkages. *Nucleic Acids Res.* **1979**, 6(9), 3009-3024.

Alt, M.; Eisenhardt, S.; Serwe, M.; Renz, R.; Engels, J.W.; Caselmann, W.H.; Comparative inhibitory potential of differently modified antisense oligodeoxynucleotides of hepatitis C virus translation. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999**, 29(10), 868-876.

Alt, M.; Renz, R.; Hofschneider, P.H.; Caselmann, W.H.; Core specific antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides as potent and specific inhibitors of hepatitis C viral translation. *Arch. Virol.* **1997**, 142, 589-599.

Alt, M.; Renz, R.; Hofschneider, P.H.; Paumgartner, G.; Caselmann, W.H.; Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Hepatology* **1995**, 22(3), 707-717.

Amberg, S.; Engels, J.W.; Phenylalkyl Backbone Modified Oligodeoxynucleotides, their Synthesis and the Influence of the Alkyl Chain Length. *Nucleosides Nucleotides* **2001**, 20(4-7), 1275-1278.

Amberg, S.; Engels, J.W.; Synthesis and Properties of Nonpolar DNA (Arylalkyl)phosphonates. *Helv. Chim. Acta* **2002a**, 85, 2503-2517.

Amberg, S.; Engels, J.W.; Synthesis, Properties and Determination of the Configuration of Arylpropyl Backbone Modified Oligodeoxynucleotides. *Collection Symposium Series (Chemistry of Nucleic Acid Components)* **2002b**, 5, 225-229.

Asseline, U.; Thuong, N.T.; Hélène, C.; Synthesis and properties of oligonucleotides covalently linked to intercalating agents. *New J. Chem.* **1997**, 21, 5-17.

Asseline, U.; Bonfils, E.; Dupret, D.; Thuong, N.T.; Synthesis and Binding Properties of Oligonucleotides Covalently Linked to an Acridine derivative: New Study of the Influence of the Dye Attachment Site. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 369-379.

Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty, M.; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.

Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Fres. J. Anal. Chem.* **1994**, 348, 783-791.

Baker, B.F.; Miraglia, L.; Hagedorn, C.H.; Modulation of eukaryotic initiation factor-E4 binding to 5'-capped oligoribonucleotides by modified antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(16), 11495-11499.

Balzarini, J.; Cools, M.; DeClercq, E.; Estimation of the lipophilicity of anti-HIV nucleoside analogues by determination of the partition coefficient and retention time on a LiChrospher 60 Rp-8 HPLC column, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1989**, 158, 413-422.

Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; The synthesis of modified oligonucleotides by phosphoramidite approach and their applications. *Tetrahedron* **1993**, 49, 6123-6194.

Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H.; Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.

Bennett, C.F.; Antisense oligonucleotides: is the glass half full, or half empty? *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 9-19.

Bergstrom, D.E.; Shum, P.W.; Synthesis and Characterization of a New Fluorine Substituted Nonionic Dinucleoside Phosphonate Analogue, *P*-Deoxy-*P*-(difluoromethyl)thymidyl(3'-5')thymidine. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3953-3958.

Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M.; Hannon, G.J.; Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **2001**, 409(6818), 363-366.

Blommers, M.J.J.; Nanz, D.; Zerbe, O.; Determination of the backbone torsion angle ϵ in nucleic acids. *Journal of Biomolecular NMR* **1994**, 4, 595-601.

Brown-Driver, V.; Eto, T.; Lesnik, E.; Anderson, K.P.; Hanecak, R.C.; Inhibition of translation of hepatitis C virus RNA by 2'-modified antisense oligonucleotides. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1999**, 9, 145-154.

Bönnemann, H.; Bogdanovic, B.; Brinkmann, R.; He, D.-W.; Spliethoff, B.; „Organisch gelöstes“ Magnesium zur Synthese von Übergangsmetall-Komplexen und – Katalysatoren. *Angew. Chem.* **1983**, 95(9), 794-795.

Bowe, C.L.; Mokhtarzadeh, L.; Venkatesan, P.; Babu, S.; Axelrod, H.R.; Sofia, M.J.; Kakarla, R.; Chan, T.Y.; Kim, J.S.; Lee, H.J.; Amidon, G.L.; Choe, S.Y.; Walker, S.; Kahne, D.; Design of compounds that increase the absorption of polar molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12218-12223.

Bradley, A.; Mining the mouse genome. *Nature* **2002**, 420, 512-514.

Brantl, S.; Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1575, 15-25.

Braasch, D.A.; Corey, D.R.; Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chemistry & Biology* **2001**, 8, 1-7.

Brown, D.M.; Todd, A.R.; Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids. *J. Chem. Soc.* **1952**, 52-58.

Buu-Hoi, Ph.; Zur Halogenierung aromatischer und heterozyklischer Verbindungen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1944**, 556, 1-7.

Caruthers, M.H.; Beaton, G.; Wu, J.V.; Wiesler, W.; Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides and deoxyoligonucleotide analogs. *Methods in Enzymol.* **1992**, 211, 3-20.

Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J.-Y; Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.

Casale, R.; McLaughlin, L.W.; Synthesis and properties of an oligodeoxynucleotide containing a polycyclic aromatic hydrocarbon site specifically bound to the N² amino group of a 2'-deoxyguanosine residue. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5264.

Casemann, W.H.; Serwe, M.; Lehmann, T.; Ludwig, J.; Sproat, B.S.; Engels, J.W.; Design, delivery and efficacy of therapeutic nucleic acids used to inhibit hepatitis C virus gene expression *in vitro* and *in vivo*. *World Journal of Gastroenterology* **2000**, *6*(5), 626-629.

Casemann, W.H.; Eisenhardt, S.; Alt, M.; Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides as Potential Drugs against Hepatitis C. *Intervirology* **1997**, *40*, 394-399.

Chacko, K. K.; Lindner, K.; Saenger, W.; Miller, P.S.; Molecular structure of deoxyadenylyl-3'-methylphosphonate-5'-thymidine dihydrate, (d-ApT•2H₂O), a dinucleoside monophosphate with neutral phosphodiester backbone. An X-ray crystal study. *Nucleic Acids Research* **1983**, *11*, 2801-2814.

Chargaff, E.; Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* **1951**, *10*, 654-659.

Chiang, M.Y.; Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1991**, *226*(27), 18162-18171.

Choo, Q.L.; Kuo, G.; Weiner, A.J.; Overby, L.R.; Bradley, D.W.; Houghton, M.; Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244*, 359-362.

Clark, C.L.; Cecil, P.K.; Singh, D.; Gray, D.M.; CD, absorption and thermodynamic analysis of repeating dinucleotide DNA, RNA and hybrid duplexes [d/r(AC)]₁₂*[d/r(GT/U)]₁₂ and the influence of Phosphorothioate substitution. *Nucleic Acids Research* **1997**, *25*(20), 4098-4105.

Clegg, R.M.; Fluorescence Resonance Energy Transfer and Nucleic Acids. *Methods in Enzymology* **1992**, 211, 353-388.

Cohen, J.; The scientific challenge of hepatitis C. *Science* **1999**, 285, 26-30.

Collins, D.J.; Rowley, L.E.; Swan, J.M.; Organophosphorus compounds. XII. A new synthesis of phosphindolines and phosphindoles. *Aust. J. Chem.* **1974**, 27, 831-839.

Conry-Cantilena, C.; Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. *Tibtech* **1997**, 15, 71-76.

Cooper, R.G.; Etheridge, C.J.; Stewart, L.; Marshall, J.; Rudginsky, S.; Cheng, S.H.; Miller, A.D.; Polyamine analogues of 3 β -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl]-cholesterol (DC-Chol) as agents for gene delivery. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4(1), 137-151.

Corey, D.R.; Braasch, D.A.; Novel Antisense and Peptide Nucleic Acid Strategies for Controlling Gene Expression. *Biochemistry* **2002**, 41(14), 4503-4510.

Corey, D.R.; Abrams, J.M.; Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *GenomeBiology* **2001**, 2(5).

Crick, F.H.C.; On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, 12, 138-163.

Crick, F.H.C.; Central dogma of molecular biology. *Nature* **1970**, 227, 561-563.

Crooke, S.T.; Progress in Antisense Technology: the End of the Beginning. *Methods Enzymol.* **2000**, 313, 2-45.

Crooke, S.T.; Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1489, 31-44.

Crooke, S.T.; Bennett, C.F.; Progress in Antisense Oligonucleotide therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1996**, 36, 107-129.

Cosstick, R.; Vyle, J.S.; Synthesis and properties of ditymidine phosphate analogues containing 3'-thiothymidine. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*(4), 829-835.

Dahl, B.H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1729-1743.

Dalley, N.K.; Xue, G.; Bradshaw, J.S.; Zhang, X.X.; Harrison, R.G.; Savage, P.B.; Krakowiak, K.E.; Izatt, R.M.; A new Diaza-18-Crown-6 Ligand Containing Two Quinolin-8-ylmethyl Side Arms: Crystal Structures and Characterization of the Ligand, the Protonated Ligand and Its Mononuclear Barium(II) and Dinuclear Copper(II) Complexes. *J. Heterocyclic Chem.* **2001**, *38*, 1-9.

Debart, F.; Rayner, B.; Degols, G.; Imbach, J.L.; Synthesis and base-pairing properties of the nuclease-resistant alpha-anomeric deoxycaribonucleotide alpha [r(UCUUAACCCACA)]. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1193-1200.

DeClercq, E.; Eckstein, F.; Steinbach, H.; Merigan, T.C.; The antiviral activity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides *in vitro*. *Virology* **1970**, *42*, 421-428.

De Diesbach, P.; Berens, C.; N'Kull, F.; Monsigny, M.; Sonveaux, E.; Wattiez, R.; Courtoy, P.J.; Identification, purification and partial characterization of an oligonucleotide receptor in membranes of HepG2 cells. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 868-874.

De Mesmaeker, A.; Häner, R.; Martin, P.; Moser, H.E.; Antisense Oligonucleotides. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 366-374.

Di Bisceglie, A.M.; Bacon, B.R.; Hepatitis C – Die stille Volksseuche. *Spektrum der Wiss.* **2000**, 28-34.

Dikalov, S.I.; Rumyantseva, G.V.; Weiner, L.M.; Sergejev, D.S.; Frolova, E.L.; Godovikova, T.S.; Zarytova, V.F.; Hydroxyl radical generation by oligonucleotide derivatives of anthracycline antibiotic and synthetic quinone. *Chem. Biol. Interactions* **1991**, *7*, 177.

Ding, Y.; Lawrence, C.E.; Statistical prediction of single-stranded regions in RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1034-1046.

Ding, Y.; Lawrence, C.E.; A bayesian statistical algorithm for RNA secondary structure prediction. *Comput. Chem.* **1999**, 23, 387-400.

Dove, A.; Antisense and sensibility. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, 121-124.

Eckstein, F. (Hrsg.); Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach. IRL Press, Oxford, **1991**.

Eckstein, F.; Bramlage, B; The Hammerhead Ribozyme. *Biopolymers* **1999**, 52, 147-154.

Eckstein, F.; Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, 10, 117-121.

Eckstein, F.; Phosphorothioate analogs of nucleotides – tools for studying biochemical processes. *Angew. Chem.* **1983**, 95, 431-447.

Eder, P.S.; DeVine, R.J.; Dagle, J.M.; Walder, J.A.; Substrate specificity and kinetics of degradation of antisense oligonucleotides by a 3' exonuclease in plasma. *Antisense Research and Development* **1991**, 1(2), 141-151.

Eisenhardt, S.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1996**, Synthese und Anwendung Phosphatrückgrat-modifizierter Antisense Oligonucleotide gegen Hepatitis C Virus RNA.

Engels, J.W.; Uhlmann, E.; Pharmaceutical Aspects of Oligonucleotides. Taylor & Francis Inc. **2000**, 35-79.

Engels, J.W.; Krankheit-Fehler in der Informationsübertragung. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, 39(11), 1250-1254.

Engels, J.W.; Jäger, A.; Eine neue Synthese von Nucleosidmethylphosphonaten. *Angew. Chem.* **1982a**, 94(12), 931.

Engels, J.W.; Jäger, A.; Eine neue Synthese von Nucleosidmethylphosphonaten. *Angew. Chem. Suppl.* **1982b**, 2010-2015.

Fattal, E.; Vauthier, C.; Aynie, I.; Nakada, Y.; Lambert, G.; Malvy, C.; Couvreur, P.; Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J. Contr. Rel.* **1998**, 53, 137-143.

Feldstein, P.A.; Buzayan, J.M.; Bruening, G.; Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene* **1989**, 82(1), 53-61.

Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M.; Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 7413-7417.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C.; Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, 391, 744-745.

Fitzgerald, M.C.; Smith, L.M.; Mass spectrometry of nucleic acids: the promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, 24, 117-140.

Flanagan, W.M.; Wagner, R.W.; Grant, D.; Lin, K.Y.; Matteucci, M.D.; Cellular penetration and antisense activity by a pheoxazine- substituted heptanucleotide. *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 48-52.

Forster, A.C.; Symons, R.H.; Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* **1987**, 49(2), 211-220.

Freier, S.M.; Altmann, K.H.; The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4429-4443.

Friedman, R.A.; Honig, B.; The Electrostatic Contribution to DNA Base-Stacking Interactions. *Biopolymers* **1992**, 32, 145-159.

Froehler, B.C.; Deoxynucleoside H-phosphonate diester intermediates in the synthesis of internucleotide phosphate analogs. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5575-5578.

Froehler, B.C.; Wadwani, S.; Terhorst, T.J. Gerrard, S.R.; Oligodeoxyribonucleotides containing C-5 propyne analogs of 2'-deoxyuridine and 2'-deoxycytidine. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5307-5310.

Fukui, K.; Tanaka, K.; The acridine ring selectively intercalated into a DNA helix at various types of abasic sites: double strand formation and photophysical properties. *Nucleic Acids Research* **1996**, 24(20), 3962-3967.

Fürstner, A.; Chemie von und mit hochaktiven Metallen. *Angew. Chem.* **1993**, 105, 171-197.

Gait, M.J.; Oligonucleotide synthesis – a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo **1984**.

Gat, Y.; lynn, D.G.; Reading DNA differently. *Biopolymers* **1998**, 48, 19-28.

Geary, R.S.; Yu, R.Z. Levin, A.A.; Pharmacokinetics of phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides. *Curr. Opin. Invest. New Drugs* **2001**, 2, 562-573.

Gessner, R.V.; Frederick, C.A.; Quigley, G.J.; Rich, A.; Wang, A. W.-J.; The Molecular Structure of the Left-handed Z-DNA Double Helix at 1.0-Å Atomic Resolution. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, 264(14), 7921-7935.

Gewirtz, A.M.; Sokol, D.L.; Ratajczak, M.Z.; Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood* **1998**, 92, 712-736.

Giles, R.V.; Ruddell, C.J.; Spiller, D.G.; Green, J.A.; Tidd, D.M.; Single base discrimination for ribonuclease H-dependent antisense effects within intact human leukemia cells. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23(6), 954-961.

Gombar, V.K.; Enslein, K.; Assessment of *n*-octanol/water partition coefficient: When is the assessment reliable? *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*; **1996**, 36, 1127-1134.

Goodchild, J.; Hammerhead ribozymes for target validation. *Expert Opin. Ther. Targets* **2002**, 6(2), 235-247.

Goodchild, J.; Agrawal, S.; Civeira, M.P.; Sain, P.S.; Sun, D.; Zamecnik, P.C.; Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5507-5511.

Gray, D.M.; Hung, S.H.; Johnson, K.H.; Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes. *Methods Enzymol.* **1995**, 246, 19-34.

Hammann, C.; Lilley, D.M.J.; Folding and Activity of the Hammerhead Ribozyme. *ChemBioChem.* **2002**, 3, 690-700.

Han, F.; Watt, W.; Duchamp, D.J.; Callahan, L.; Kézdy, F.J.; Agarwal, K.; Molecular structure of deoxycytidyl-3'-methylphosphonate (Rp) 5'-deoxyguanine, d[Cp(CH₃)G]. A neutral dinucleotide with Watson-Crick base pairing and a right handed helical twist. *Nucleic Acids Research* **1990**, 18(9), 2759-2767.

Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Fox, M.C.; Azad, R.F.; Furusako, S.; Nozaki, C.; Ford, C.; Sasmor, H.; Anderson, K.P.; Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus gene expression in transformed hepatocytes. *J. Virol.* **1996**, 70(8), 5203-5212.

Hanessian, S.; Lavalley, P.; The preparation and synthetic utility of *tert*-butyldiphenylsilyl ethers. *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2975-2977.

Haseloff, J.; Gerlach, W.L.; Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **1988**, 334(6183), 585-591.

Hayakawa, Y.; Kataoka, M.; Noyori, R.; Binzimidazolium triflate as an efficient promoter for nucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7996-7997.

Hayakawa, Y.; Hirose, M.; Hayakawa, M.; Noyori, R.; General Synthesis and Binding Affinity of Position-Selective Phosphonodiester- and Phosphotriester-Incorporated Oligodeoxyribonucleotides. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 925-930.

Heasman, J.; Morpholino Oligos: Making Sense of Antisense? *Developmental Biology* **2002**, *243*, 209-214.

Heintges, T.; Kraszucka, K.; Erhardt, A.; Petry, W.; Häussinger, D.; Molekularbiologische Strategien zur Behandlung der chronischen Virushepatitis. *Verdauungskrankheiten* **2000**, *18*(3), 148-154.

Hélène, C.; Sun, J-S.; Francois, J-C.; Monternay-Garestier, T.; Saison-Behmoaras, T.; Roig, V.; Thuong, N.T.; Sequence-specific intercalating agents: Intercalation at specific sequences on duplex DNA via major groove recognition by oligonucleotide-intercalator conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 9198-9202.

Hélène, C.; Asseline, U.; Thuong, N.T.; Oligonucleotides Covalently Linked to Intercalating Agents. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*(15), 8936-8941.

Hendrix, C.; Rosemeyer, H.; Verheggen, I.; Seela, F.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; 1',5'-Anhydrohexitol oligonucleotides: synthesis, base pairing and recognition by regular oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides. *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 110-120.

Herdewijn, P.; Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **2000**, *10*(4), 297-310.

Hjalt, T.; Wagner, E.G.H.; The effect of loop size in antisense and target RNAs on the efficiency of antisense RNA control. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*(24), 6723-6732.

Hogrefe, R.I.; Vaghefi, M.M.; Reynolds, M.A.; Young, K.M.; Arnold Jr., L.J.; Deprotection of Methylphosphonate oligonucleotides using a novel one-pot procedure. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21(9), 2031-2038.

Honda, M.; Beard, M.R.; Ping, L-H.; Lemon, S.M.; A Phylogenetically Conserved Stem-Loop Structure at the 5' Border of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Is Required for Cap-Independent Viral Translation. *Journal of Virology* **1999**, 73(2), 1165-1174.

Honda, M.; Brown, E.A.; Lemon, S.M.; Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* **1996**, 2, 955-968.

Hooz, J.; Gilani, S.S.H.; A rapid, mild procedure for the preparation of alkyl chlorides and bromides. *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 86-87.

Hopfinger, A.J.; Cardozo, M.G.; Kawakami, Y.; Molecular Modelling of Ligand-DNA Intercalation Interactions. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1995**, 91(16), 2515-2524.

Hughes, J.; Hoon Yoo, A.A.; Alahari, S.; Liang, E.; Sergueev, D.; Shaw, B.R.; Juliano, R.L.; In vitro Transport and Delivery of Antisense Oligonucleotides, *Methods Enzymol.* **2000**, 313, 342-358.

Huisgen, R.; Rapp, W.; Ugi, I.; Walz, H.; Glogger, I.; Darstellung und Eigenschaften der 1,2,3,4-Benzo-cycla-1,3-dienone. *Liebigs Analen der Chemie* **1954**, 586(60), 52-69.

Hunter, C.A.; Sanders, J.K.M.; The Nature of π - π Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525-5534.

Idéo, G.; Bellobuone, A.; New Therapies for the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Current Pharmaceutical Design* **2002**, 8, 959-966.

Imanishi, T.; Obika, S.; Stability and structural features of the duplexes containing the nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methylene-ribonucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5401-5404.

International Human Genome Sequencing Consortium; Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, 409, 860-922.

Ippel, J.H.; Wijmenga, S.S.; de Jong R.; Heus, H.A.; Hilbers, C.W.; de Vroom, E.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Heteronuclear Scalar Couplings in the Bases and Sugar Rings of Nucleic Acids: Their Determination and Application in assignment and Conformational Analysis. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1996**, 34, S156-S176.

IUPAC-IUB Joint Commision on Biochemical Nomenclature (JCBN), Abbrevations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains. *Eur. J. Biochem.* **1983**, 131, 9-15.

Iyer, R.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L.; 3*H*-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1253-1254.

Jacob, F.; Monod, J.; Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 318-356.

Jen, K.Y.; Gewirtz, A.M. Suppression of Gene Expression by Targeted Disruption of Messenger RNA: Available Options and Current Strategies. *Stem Cells* **2000**, 18, 307-319.

Juliano, R.L.; Alahari, S.; Yoo, H.; Kole, R.; Cho, M.; Antisense pharmacodynamics: Critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm. Res.* **1999**, 16(4), 494-502.

Kamath, R.S.; Fraser, A.G.; Dong, Y.; Poulin, G.; Durbin, R.; Gotta, M.; Kanapin, A.; Le Bot, N.; Moreno, S.; Sohrmann, M.; Welchman, D.P.; Zipperlen, P.; Ahringer, J.; Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **2003**, 421, 231-237.

Kan, L.; Boal, J.; Ts'o, O.P.; An Evaluation of Proton Spin-Lattice Relaxation Rates and NOE's for Calibration of Interproton Distance Measurements in Nucleic Acids. *Bull. Inst. Chem., Academia Sinica* **1993**, 40, 55-66.

Kanaya, S.; Ikehara, M.; Structure and function of ribonuclease H1 from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids and Mol. Biol.* **1993**, 7, by Eckstein, F.; Lilley, D.M.J.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Karas, M.; Hillenkamp, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301.

Kasahara, A.; Treatment strategies for chronic hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol* **2000**, 35, 411-423.

Kawasaki, A.M.; Casper, M.D.; Freier, S.M.; Lesnik, E.A.; Zounes, M.C.; Cummins, L.L.; Gonzalez, C.; Cook, P.D.; Uniformly modified 2'-deoxy-2'-deoxy-2'-fluorophosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 831-841.

Kelly, T.J.jr.; Smith, H.O.; A restriction enzyme from *Hemophilus influenza*, II. Base Sequence and recognition site. *J. Mol. Biol.* **1970**, 51, 393-409.

Khorana, H.G.; Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed. Proc.* **1965**, 24, 1473-1487.

Koizumi, M.; Ohtsuka, E.; Effects of phosphorothioate and 2-amino groups in hammerhead ribozymes on cleavage rates and Mg^{2+} binding. *Biochemistry* **1991**, 30(21), 5145-5150.

Koziolekiewicz, M.; Drakowiak, A.; Kwinkowski, M.; Boczkowska, M.; Stec.; W.J.; Stereodifferentiation – the effect of P chirality of oligo(nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 5000-5005.

Koziolekiewicz, M.; Wojcik, M.; Kobylanska, A.; Karwowski, B.; Rebowska, B.; Guga, P.; Stec, W.J.; Stability of stereoregular oligo(nucleoside Phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* **1997**, 7, 43-48.

Kramer, W.; Stengelin, S.; Baringhaus, K.H.; Enhnen, A.; Heuer, H.; Becker, W.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Noll, R.; Weyland, C.; Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *Journal of Lipid Research* **1999**, 40(9), 1604-1617.

Krupp, G.; Gaur, R.K. (Hrsg.); Ribozyme, Biochemistry and Biotechnology. BioTechniques Books, Natick (USA), **2000**.

Kunz, P.; Über die o-Chlorphosphine des Phenols und der Naphthole. *Chem. Ber.* **1894**, 27, 2563-2576.

Kurz, M.; Göbel, K. Hartel, C. Göbel, M.W.; Acridine-Labeled Primers as Tools for the Study of Nonenzymatic RNA Oligomerization. *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 1156-1180.

Larson, H.J.; Bentin, T.; Nielsen, P.E.; Antisense properties of peptide nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1489, 159-166.

Lawson, T.G.; Ray, B.K.; Dodds, J.T.; Grifo, J.A.; Abramson, R.D.; Merrick, W.C.; Betsch, D.F.; Weith, H.L.; Thach, R.E.; Influence of 5'proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261(30), 13979-13989.

Lebedev, A.V.; Wickstrom, E.; The chirality problem in P-substituted oligonucleotides. *Perspectives in Drug Discovery and Design* **1996**, 4, 17-40.

Lebedev, A.V.; Frauendorf, A.; Vyazovkina, E.V.; Engels, J.W.; Determination and prediction of the absolute configuration of dinucleoside alkylphosphonates using conformational analysis and multivariate statistics. *Tetrahedron* **1993**, 49(5), 1043-1052.

Lehmann, T.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **2001**, Synthese, Eigenschaften und Anwendung Gallensäure derivatisierter Antisense Oligonukleotide gegen Hepatitis C Virus RNA.

Lehmann, T.J.; Engels, J.W.; Synthesis and Properties of Bile Acid Phosphoramidites 5'-Tethered to Antisense Oligodeoxynucleotides Against HCV. *Bioorg. & Med. Chem.* **2001b**, 9, 1827-1835.

Lehmann, T.J.; Serwe, M.; Caselmann, W.H.; Engels, J.W.; Design and properties of hepatitis C virus antisense oligonucleotides for liver specific drug targeting. *Nucleosides Nucleotides* **2001**, 4-7, 1343-1346.

Lehmann, T.J.; Schwarzer, K.; Schweitzer, M.; Engels, J.W.; Thermodynamic and CD-spectroscopic characterization of self-complementary methyl- and benzyl-modified d(CGCGGCG)-hexamers. *Collection Symposium Series* **1999**, 2, 302-305.

Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B.; Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655-3661.

Leumann, C.J.; DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties. *Bioorg. & Med. Chem.* **2002**, 10, 841-854.

Levin, A.A.; Henry, S.P.; Monteith, D.; Templin, M.V.; Toxicity of antisense oligonucleotides. *Antisense Drug Technology* **2001**, 201-267.

Levis, J.T.; Butler, W.O.; Tseng, B.Y.; Ts'O, P.O.P.; Cellular uptake of oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates. *Antisense Res. Dev.* **1995**, 5, 251-259.

Lien, E.J.; Gao, H.; Prabhakar, H.; Physical factors contributing to the partition coefficient and retention time of 2',3'-dedeoxynucleoside analogues. *J. Pharm. Sci.* **1991**, 80, 517-521.

Loke, S.L.; Stein, C.A.; Zhang, X.H.; Mori, K.; Nakanishi, M.; Subasinghe, C.M.; Cohen, J.S.; Neckers, L.M.; Characterization of Oligonucleotide transport into living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3474-3478.

Löschner, T.; Engels, J.W.; Diastereomeric dinucleoside-methylphosphonates: determination of configuration with the 2-D NMR ROESY technique. *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18(17), 5083-5088.

Löschner, T.; Engels, J.W.; Methylphosphonamidites: Preparation and application on oligodeoxynucleoside Methylphosphonate synthesis. *Nucleosides Nucleotides* **1988**, *7*, 729-732.

Mag, M.; Muth, J.; Jahn, K.; Peyman, A.; Dretschmar, G.; Engels, J.W.; Uhlmann, E.; Synthesis and Binding Properties of Oligodeoxynucleotides Containing Phenylphosphon(othio)ate Linkages. *Bioorg. & Med. Chem.* **1997**, *5*(12), 2213-2220.

Mag, M.; Jahn, K.; Kretschmar, G.; Peyman, A.; Uhlmann, E.; Synthesis and Duplex Stability of Oligodeoxynucleotides Containing Stereoregular or Stereorandom Octylphosphonate Linkages. *Tetrahedron* **1996**, *52*(30), 10011-10024.

Maidwell, N.L.; Rezai, M.R.; Roeschlaub, C.A.; Sammes, P.G.; On the development of NAD(P)H-sensitive fluorescent probes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, *10*, 1541-1546.

Manoharan, M.; Oligonucleotide Conjugates as Potential Antisense Drugs with Improved Uptake, Biodistribution, Targeted Delivery, and Mechanism of Action. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **2002**, *12*, 103-128.

Marcus-Sekura, C.J.; Wörner, A.M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Quinnan, G.V.J.; Comparative inhibition of chloramphenicol acetyltransferase gene expression by antisense oligonucleotide analogs having alkyl phosphotriester, Methylphosphonate and Phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 5749-5763.

Marky, L.A.; Breslauer, K.J.; Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Methods Enzymol.* **1987**, *26*, 1601-1620.

Marshall, E.; Rival genome sequencers celebrate a milestone together. *Science* **2000**, *288*, 2294-2295.

Maxam, A.M.; Gilbert, W.; A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 560-564.

McHutchinson, J.G.; Patel, K.; Future Therapy of Hepatitis C. *Hepatology* **2002**, 36, S245-S252.

Melcher, S.E.; Wilson, T.J.; Lilley, D.M.J.; The dynamic nature of the four-way junction of the hepatitis C virus IRES. *RNA* **2003**, 9, 809-820.

Meyer, E.A.; Castellano, R.K.; Diederich, F.; Wechselwirkungen mit aromatischen Ringen in chemischen und biologischen Erkennungsprozessen. *Angew. Chem.* **2003**, 115(11), 1244-1287.

Micklefield, J.; Backbone Modification of Nucleic Acids: Synthesis, Structure and Therapeutic Applications. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 1157-1179.

Micura, R.; Kurze interferierende RNA und ihre chemische Synthese. *Angew. Chem.* **2002**, 114(13), 2369-2373.

Miller, P.S.; Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Biochemistry* **1991**, 9(4), 358-362.

Miller, P.S.; Yano, J.; Yano, E.; Carroll, C.; Jayaramen, K.; Ts'o, P.O.P.; Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* **1979**, 18(23), 5134-5143.

Milligan, J.F.; Matteucci, M.D.; Martin, J.C.; Current concepts in antisense drug design. *J. Med. Chem.* **1993**, 36(14), 1925-1937.

Misquitta, L.; Paterson, B.M.; Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96(4), 1451-1456.

Monia, B.P.; Lesnik, E.A.; Gonzalez, C.; Lima, W.F.; McGee, D.; Guinosso, C.J.; Kawasaki, A.M.; Gook, P.D.; Freier, S.M.; Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 14514-14522.

Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J.L.; Alpha-oligonucleotides: a unique class of modified chimeric nucleic acids. *Anti Cancer Drug Des.* **1991**, 6, 521-529.

Mullis, K.B.; Eine Nachtfahrt und die PCR. *Spektrum der Wissenschaft* **1990**, 60-67.

Newton, C.R.; Graham, A.; PCR. Spektrum Verlag, 2 ed. **1997**.

Nirenberg, M.W.; Matthaei, J.H.; Jones, O.W.; Martin, R.G.; Barondes, S.H.; Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA. *Fed. Proc.* **1963**, 22, 55-61.

Oae, S; VanderWerf C.A.; Relative Reactivities of Organic Halides in Displacement Reactions. II. Reaction of Mercuric Nitrate with Some Normal Chain Alkyl and Arylalkyl Bromides. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5037-5039.

Ochoa, S.; Synthetic polynucleotides and the genetic code. *Fed. Proc.* **1963**, 22, 62-74.

Ogilvie, K.K.; The *tert*-butyldimethylsilyl group as a protecting group in deoxynucleosides. *Can. J. Chem.* **1973**, 51, 3799-3807.

Opalinska, J.B.; Gewirtz, A.M.; Nucleic-Acid Therapeutics: Basic Principles and Recent Applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, 1, 503-514.

Ossipov, D.; Chattopadhyaya, J.; Synthesis of 1'-Phenyzine-Tethered Psicofuranosyl Oligonucleotides: The Thermal Stability and Fluorescence Properties of Their Duplexes and Triplexes. *Tetrahedron* **1998**, 29, 5667-5682.

Parsch, J.; Engels, J.W.; Synthesis of Fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic Acid Analogues and Their Influence on Stability of RNA Duplexes. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 1791-1808.

Parsch, J.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **2001**, Synthese von Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-Nukleosiden und ihr Einfluß auf die Stabilität von RNA Duplexen.

Parsch, J.; Engels, J.W.; C-F...H-C Hydrogen Bonds in Ribonucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5664-5672.

Parsch, U.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1999**, 6-Oxocytidin – ein Baustein für die pH-unabhängige Triplexhelix- Bildung.

Patzel, V.; Steidl, U.; Kronenwett, R.; Haas, R.; Sczakiel, G.; A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 4328-4334.

Perbost, M.; Hoshiko, T.; Morvan, F.; Swayze, E.; Griffey, R.H.; Sanghvi, Y.S.; Synthesis of 5'-O-amino-2'-deoxypyrimidine and purine nucleosides: building-blocks for antisense oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 5150-5156.

Peyman, A.; Helsberg, M.; Kretzschmar, G.; Mag, M.; Rytte, A.; Uhlmann, E.; Nuclease stability as dominant factor in the antiviral activity of oligonucleotides directed against HSV-1 E110. *Antiviral Res.* **1997**, 33(2), 135-139.

Pockros, P.; Developments in the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, 11(4), 515-528.

Privat, E.; Asseline, U.; Synthesis and Binding Properties of Oligo-2'-deoxyribonucleotides Covalently Linked to a Thiazole Orange derivative. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 757-769.

Puglisi, J.D.; Tinoco, I.; Absorbance melting curves of RNA. *Methods Enzymol.*; **1989**, 180, 304-325.

Puri, N.; Zamaratski, E.; Sund, C.; Chattopadhyaya, J.; Synthesis of 5'-Polyarene-Tethered Oligo-DNAs and the Thermal Stability and Spectroscopic Properties of Their Duplexes and Triplexes. *Tetrahedron* **1997**, 53(30), 10409-10432.

Raston, C.L.; Salem, G.; Magnesium Anthracene: An Alternative to Magnesium in the High Yield Syntheses of Grignard Reagents. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1702-1703.

Reddy, M.P.; Farooqui, F.; Hanna, N.B.; Elimination of transamination side product by the use of dC^{Ac} methylphosphonamidite in the synthesis of oligonucleoside methylphosphonates. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(48), 8691-8694.

Reynolds, M.A.; Hogrefe, R.I.; Jaeger, J.A.; Schwartz, D.A.; Rilex, T.A.; Marvin, W.B.; Daily, W.J. Vaghefi, M.M.; Beck, T.A.; Knowles, S.K.; Klem, R.E.; Arnold, L.J.; Synthesis and thermodynamics of oligonucleotides containing chirally pure Rp Methylphosphonate linkages. *Nucleic Acids Research* **1996**, 24(22), 4584-4591.

Rieke, R.D.; *Science* **1989**, 246, 1260.

Rieke, R.D.; Hudnall, P.M.; Activated Metals. IV. Preparation and Reactions of Highly Reactive Magnesium Metal. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96(6), 1775-1781.

Rosenberg, S.; Recent Advances in the Molecular Biology of Hepatitis C Virus. *J. Mol. Biol.* **2001**, 313, 451-464.

Rowley, L.E.; Swan, J.M.; Organophosphorus Compounds. X A New Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydrophosphinolines. *Aust. J. Chem.* **1974**, 27, 801-813.

Saenger, W.; Principles of nucleic acid structure. Springer Verlag, New York Berlin, **1984**.

Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N.; Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**, 230, 1350-1354.

Sakamoto, N.; Wu, C.H.; Wu, G.Y.; Intracellular Cleavage of Hepatitis C Virus RNA and Inhibition of Viral Protein Translation by Hammerhead Ribozymes. *J. Clin. Invest.* **1996**, 98(12), 2720-2728.

Samstag, W.; Engels, J.W.; Stereoselektive Synthese phosphatmodifizierter DNA-Bausteine. *Angew. Chem.* **1992**, 104(10), 1367-1369.

Samstag, W.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1994**, Synthese, Charakterisierung und Anwendung phosphatmodifizierter DNA-Analoga.

Samstag, W.; Eisenhardt, S.; Offensperger, W.B.; Engels, J.W.; Synthesis and properties of new antisense oligodeoxynucleotides containing Benzylphosphonate linkages. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, 6, 153-156.

Sanghvi, Y.S.; Heterocyclic Base Modifications in Nucleic Acids and their Applications in Antisense Oligonucleotides. *In Antisense Research and Applications*; Crooke, S.T.; Lebleu, B.; Eds.; CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, **1993**, 273-288.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 5463-5467.

Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G.; Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleosides-3'phosphates. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827.

Schell, P.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1998**, Untersuchungen zur diastereoselektiven Synthese von Methylphosphonaten nach der Phosphoramiditmethode.

Schepers, U.; Kolter, T.; RNA-Interferenz: ein neuer Weg zur Analyse von Proteinfunktionen. *Angew. Chem.* **2001**, 113(13), 2503-2505.

Scherr, M.; Rossi, J.J.; Sczakiel, G.; Patzel, V.; RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 2455-2461.

Scherr, M.; Rossi, J.J.; Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Research* **1998**, 26 (22), 5079-5085.

Schlingensiepen, R.; Brysch, W.; Schlingensiepen, K.-H.; Antisense – from technology to therapy. Blackwell Science; Berlin, Wien **1997**.

Schwab, G.; Chavany, C.; Duroux, I.; Goubin, G.; Lebeuau, J.; Hélène, C.; Saison-Behmoaras, T.; Antisense oligonucleotides absorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated *Ha-ras*-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10460-10464.

Schwarzer, K.; *Diplomarbeit*, Frankfurt am Main **1997**, Synthese und Eigenschaften von diastereoselektiven Methylphosphonaten.

Schweitzer, M.; Engels, J.W.; Sequence Specific Hybridization Properties of Methylphosphonate Oligodeoxynucleotides. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **1999**, *16*(6), 1177-1188.

Schweitzer, M.; *Dissertation*, Frankfurt am Main **1998**, Synthese und Untersuchung chemisch modifizierter DNA am Beispiel der Oligonucleosid-Methylphosphonate.

Sczakiel, G.; Theoretical and experimental approaches to design effective antisense oligonucleotides. *Front. Biosci.* **2000**, *5*, D194-D201.

Searles, S.; The Reaction of Trimethylene Oxide with Grignard Reagents and Organolithium Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 124-125.

Silver, G.C.; Sun, J.-S.; Nguyen, C.H.; Boutorine, A.S.; Bisagni, E.; Hélène, C.; Stable Triple-Helical DNA Complexes Formed by Benzopyridoindole- and Benzopyridoquinoxaline- Oligonucleotide Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 263-268.

Smith, H.O.; Wilcox, K.W.; A restriction enzyme from *Hemophilus influenza*, I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **1970**, *51*, 379-391.

Smith, S.A.; McLaughlin, L.A.; Probing contacts to the DNA backbone in the *trp* repressor-operator sequence-specific protein-nucleic acid complex using diastereomeric methylphosphonate analogues. *Biochemistry* **1997**, *36*(20), 6046-6058.

Snatzke, G.; Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I. *Chemie in unserer Zeit* **1981**, 3, 78-87.

Snatzke, G.; Chiroptische Methoden in der Stereochemie II. *Chemie in unserer Zeit* **1982**, 5, 160-168.

Starke, D.; Lischka, K.; Pagels, P.; Uhlmann, E.; Kramer, W.; Wess, G.; Petzinger, E.; Bile acid-oligodeoxynucleotide conjugates: synthesis and liver excretion in rats. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 945-949.

Stec, W.J.; Wilk, A.; Stereokontrollierte Synthese von Oligonucleosid-phosphorothioaten. *Angew. Chem.* **1994**, 106, 747-761.

Stec, W.J.; Lesnikowske, Z.J.; Jaworska, M.; Octa(thymidine methanephosphonates) of partially defined stereochemistry: synthesis and effect of chirality at phosphorus on binding to pentadecadeoxyriboadenylic acid. *Nucleic Acids Research* **1990**, 18, 2109-2114.

Stein, C.A.; Dias, N.; Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, 1, 347-355.

Stein, C.A.; Cheng, Y.C.; Antisense oligonucleotides as therapeutic agents – Is the bullet really magical? *Science* **1993**, 261, 1004-1012.

Stein, C.A.; Tonkinson, J.L.; Yakubov, L.; Anti-sense inhibitors of gene expression? *Pharmacology & Therapeutics* **1991**, 52(3), 365-384.

Stephenson, M.L.; Zamecnik, P.C.; Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75(1), 285-288.

Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.

Summerton, J.; Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H independent structural type. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1489(1), 141-158.

Summerton, J.; Weller, D.; Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation and Properties. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1997**, 7, 187-195.

Sun, J.-S.; Garestier, T.; Hélène, C.; Oligonucleotide directed triple helix formation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 327.

Szabó, T.; Stawinski, J.; Synthesis and some conformational features of the 5'-deoxy-5'-methylphosphonate linked dimer, 5'-deoxy-5'-C-(phosphonomethyl) thymidin-3'-yl(thymidin-5'-yl)methylphosphonate [p(CH₂)Tp(CH₂)T]. *Tetrahedron* **1995**, 51(14), 4145-4160.

Tada, M.; Hiratsuka, M.; Goto, H.; Photolyses of (3-Naphthoxypropyl)-, (4-Naphtylbutyl)-, and (4-Naphthyl-4-oxobutyl)cobaloxime. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4364-4370.

Tanaka, K.; Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, 2, 151-153.

Temsamani, J.; Roskey, A.; Chaix, C.; Agrawal, S.; In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* **1997**, 7, 159-165.

Teuber, H.-J.; Staiger, G.; Reaktionen mit Nitrosodisulfonat, VIII. Mitteil.: ortho-Benzochinone und Phenazine. *Chem. Ber.* **1955**, 88, 802-807.

Ti, G.S.; Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; Transient protection: efficient one-flask syntheses of protected oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 1316-1319.

Tung, C.-H.; Guan, J.-Q.; Regioselectivity in the Photocycloaddition of 9-Substituted Anthracenes Incorporated within Nafion membranes. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 5857-5862.

Tuplin, A.; Wood, J.; Evans, D.J.; Patel, A.H.; Simmonds, P.; Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus. *RNA* **2002**, 8, 824-841.

Tuschl, T.; Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Meyer, J.; Borkhardt, A.; New microRNAs from mouse and human. *RNA* **2003a**, 9, 175-179.

Tuschl, T.; RNA sets the standard. *Nature* **2003b**, 421, 220-221.

Tuschl, T.; RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBioChem*. **2001a**, 2(4), 239-245.

Tuschl, T.; Elbashir, S.M.; Lendeckel, W.; RNA interference and small interfering RNAs. *Genes Dev*. **2001b**, 15, 188-200.

Uhlmann, E.; Peyman, A.; Ryte, A.; Schmidt, A.; Buddecke, E.; Use of minimally modified antisense oligonucleotides for specific inhibition of gene expression. *Methods Enzymol*. **1999**, 313, 268-284.

Uhlmann, E.; Antisense-Oligonucleotide- ein universelles Therapieprinzip. *Chemie in unserer Zeit* **1998**, 3, 150-160.

Uhlmann, E.; Peyman, A.; Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. *Chem. Rev*. **1990**, 90(4), 543-584.

Van De Ven, F.J.M.; Hilbers, C.W.; Nucleic acids and nuclear magnetic resonance. *Eur. J. Biochem*. **1988**, 178, 1-38.

Van Tol, H.; Buzayan, J.M.; Feldstein, P.A.; Eckstein, F.; Bruening, G.; Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res*. **1990**, 18(8), 1971-1975.

Varian; Mitteilung der technischen Abteilung, Varian Darmstadt, **1998**.

Vasquez, K.M.; Wilson, J.; Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends Biochem. Sci*. **1998**, 23, 4.

Vlassov, V.V.; Balakireva, L.A.; Yakubov, L.A.; Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1197, 95-108.

Vu, H.; Hirschbein, B.L.; Internucleotide phosphite sulfurization with tetraethylthiuram disulfide. Phosphorothioate Oligonucleotide synthesis via phosphoramidite chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3005-3008.

Walder, R.Y.; Walder, J.A.; Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5011-5015.

Wang, A.H.-J.; Quigley, G.J.; Kolpak, F.J.; Crawford, J.L.; Van Boom, J.H.; Van der Marel, G.; Rich, A.; Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, 282, 680-686.

Wang, C.; Le, S.Y.; Ali, N.; Siddiqui, A.; An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA* **1995a**, 1, 526-537.

Wang, C.; Siddiqui, A.; Structure and function of the Hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Curr. Top. Microbiol.* **1995b**, 203, 99-115.

Wargelius, A.; Ellingsen, S.; Fjose, A.; Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 263(1), 156-161.

Watson, J.D.; Crick, F.H.C.; Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **1953a**, 171, 737-738.

Watson, J.D.; Crick, F.H.C.; Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* **1953b**, 171, 964-967.

Weber, M.; Neue Techniken zum Gentransfer in Eukaryontenzellen. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **2000**, 48, 18-23.

Weintraub, H.M.; Anti-Sense-DNA und -RNA: komplementäre Codes mit Sinn. *Spektrum der Wiss.* **1990**, 3, 70-77.

Wengel, J.; Koshkin, A.A.; Rajwanshi, V.K.; Novel convenient syntheses of LNA [2.2.1]bicyclo nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4381-4384.

Witherell, G.W.; ISIS-14803 Isis Pharmaceuticals; *Current Opinion in Investigational Drugs* **2001**, 2(11), 1523-1529.

Woody, R.W.; Circular Dichroism. *Methods in Enzymology* **1995**, 246(34), 34-70.

World Health Organization (WHO); Hepatitis C – Global Surveillance Update. *Weekly Epidemiological Record* **2000**, 75, 17-28.

Wickstrom, E.; Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1986**, 13(2), 97-102.

Yakubov, L.A.; Deeva, E.A.; Zarytova, V.F.; Ivanova, E.M.; Ryte, A.S.; Yurchenko, L.V.; Vlassov, V.V.; Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1989**, 87, 6454-6458.

Yamana, K.; Aota, R.; Nakano, H.; Oligonucleotides Having Covalently Linked Anthracene at Specific Sugar Residue: Differential Binding to DNA and RNA and Fluorescence Properties. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36(46), 8427.

Zamaratski, E.; Chattopadhyaya, J.; Synthesis of Phenazine-tethered Arabino and Xylofuranosyl Oligonucleotide Conjugates: The Thermal Stability and Fluorescence Properties of Their Duplexes (DNA-DNA & DNA RNA) & Triplexes. *Tetrahedron* **1998**, 54, 8183-8206

Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L.; Inhibition of Rous sarcoma virus RNA replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75(1), 280-284.

Zhang, H.; Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Azad, R.; Conklin, B.; Fox, M.C.; Anderson, K.P.; Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43(2), 347-353.

14

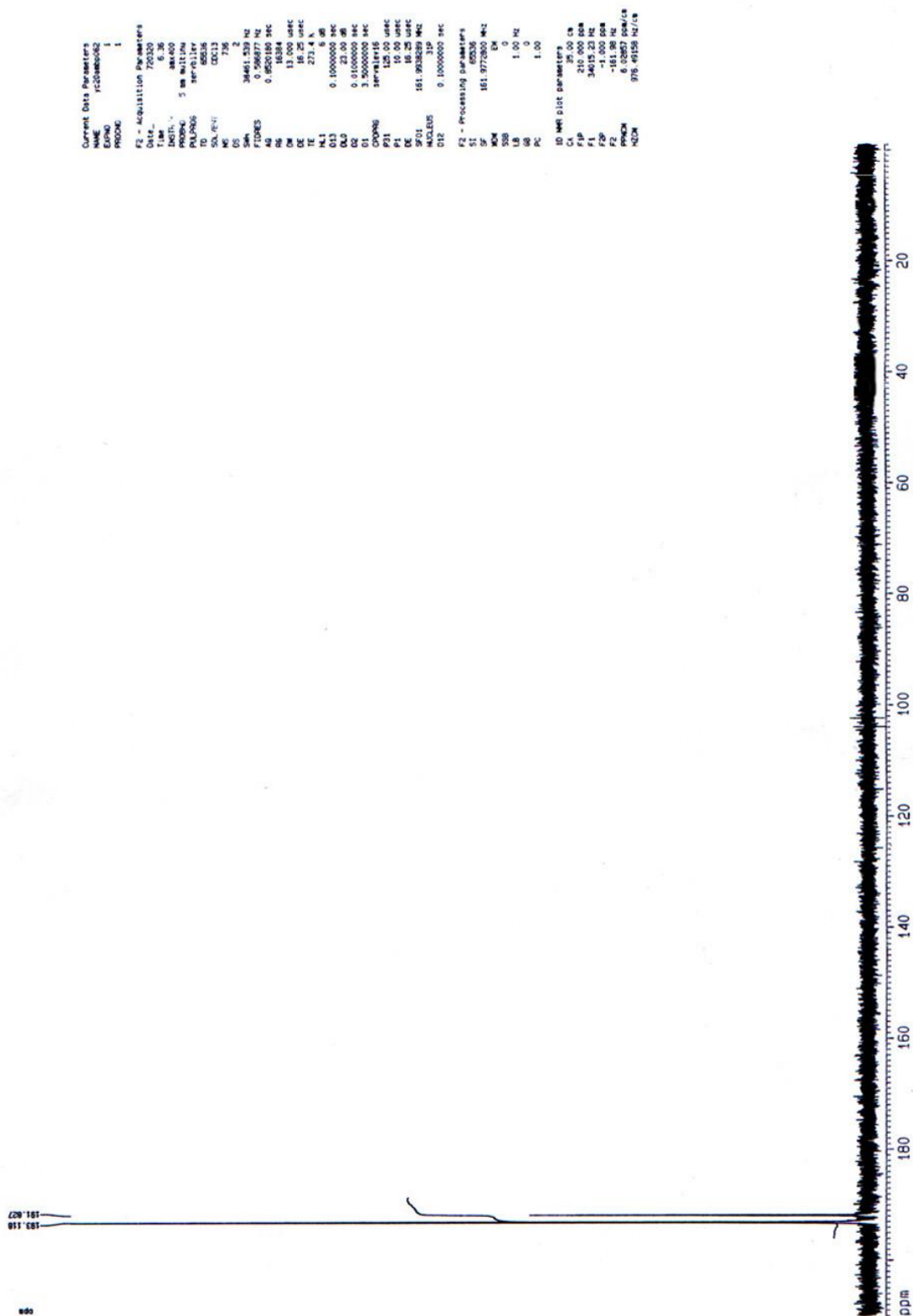
Anhang

Teil A Ausgewählte Spektren

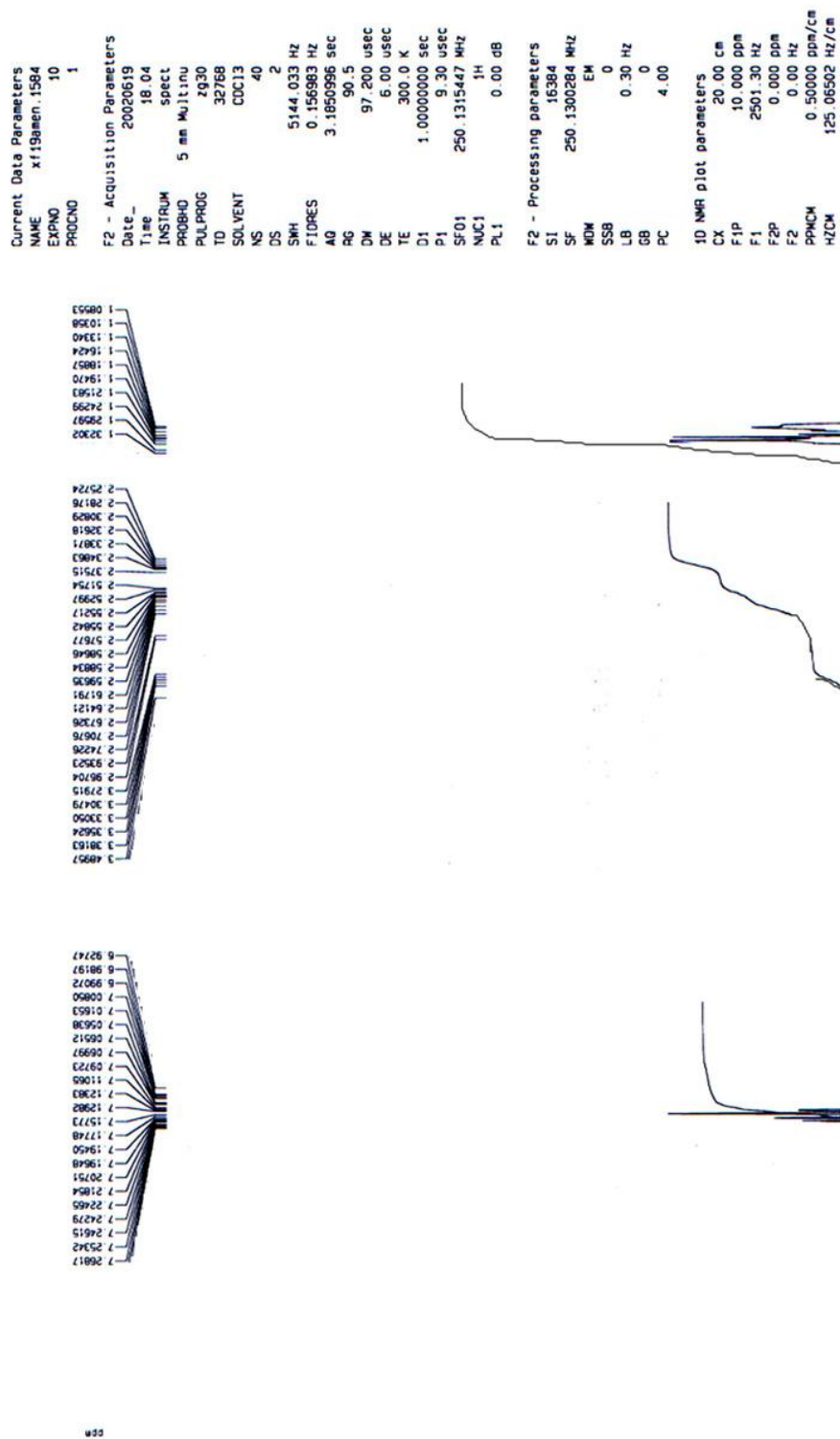
- A1** ^1H -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethylchlorphosphan **50**
- A2** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethylchlorphosphan **50**
- A3** ^1H -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75**
- A4** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75**
- A5** ^1H -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl]- N^4 -isobutyrylcytidin **104**
- A6** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl]- N^4 -isobutyrylcytidin **104**
- A7** ^1H -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzylchlorphosphan **69**

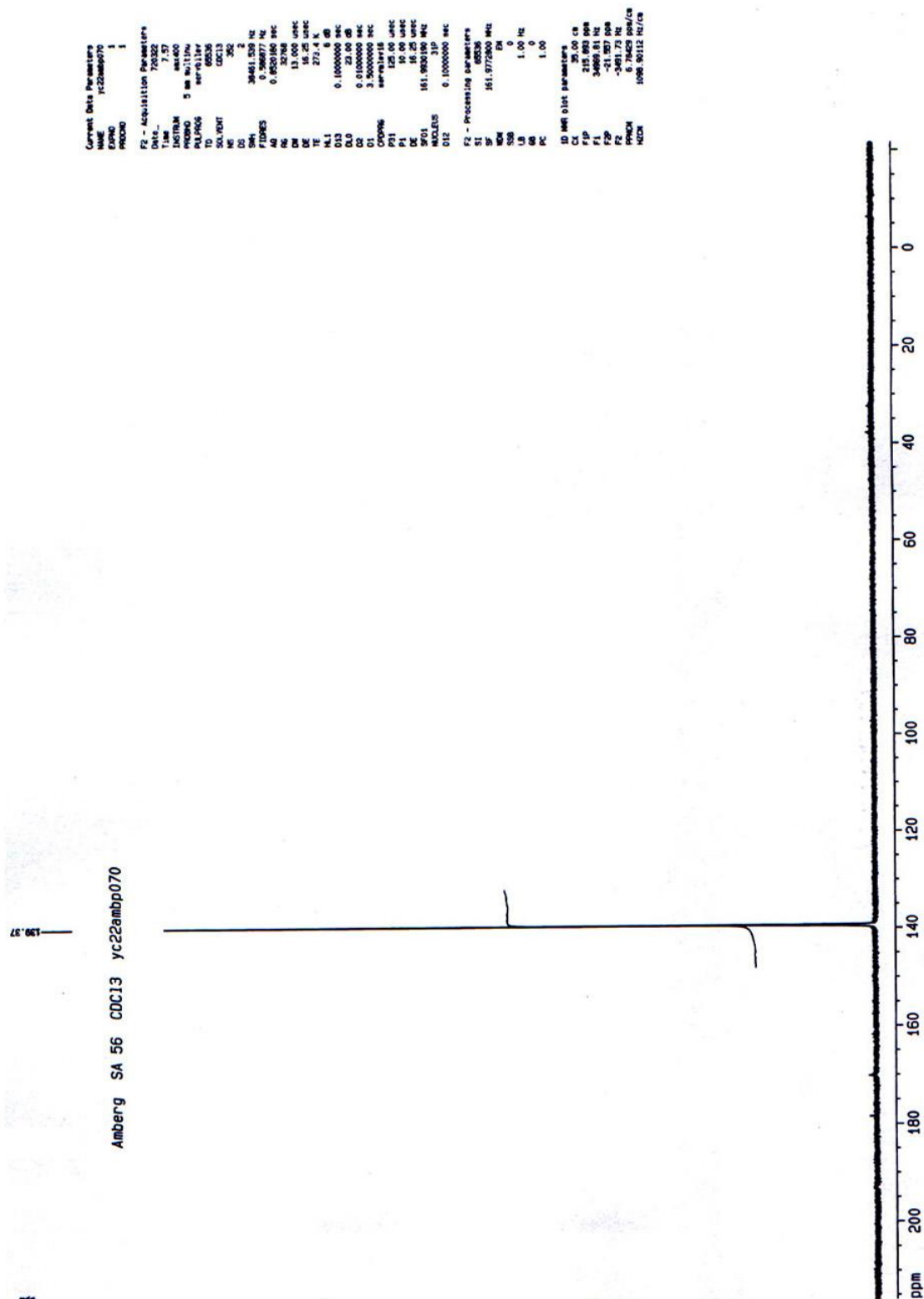
- A8** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzylchlorphosphan **69**
- A9** ^1H -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83**
- A10** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83**
- A11** ^1H -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl]- N^4 -isobutyrylcytidin **116**
- A12** ^{31}P -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl]- N^4 -isobutyrylcytidin **116**
- A13** ^1H -NMR-Spektrum des Rp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Rp**
- A14** ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Rp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Rp**
- A15** ^1H -NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Sp**
- A16** ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Sp**
- A17** 2D-ROESY-NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Sp**
- A18** ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Rp-konfigurierten (2'-Desoxycytidin-3-yl)-(2'-desoxyguanosin-5-yl) 3-phenylpropylphosphonat **142Rp**
- A19** ESI(-)-Massenspektrum des Rp-konfigurierten (2'-Desoxycytidin-3-yl)-(2'-desoxyguanosin-5-yl) 3-phenylpropylphosphonat **142Rp**

A2 ³¹P-NMR-Spektrum vom 2-Phenylethylchlorphosphan 50

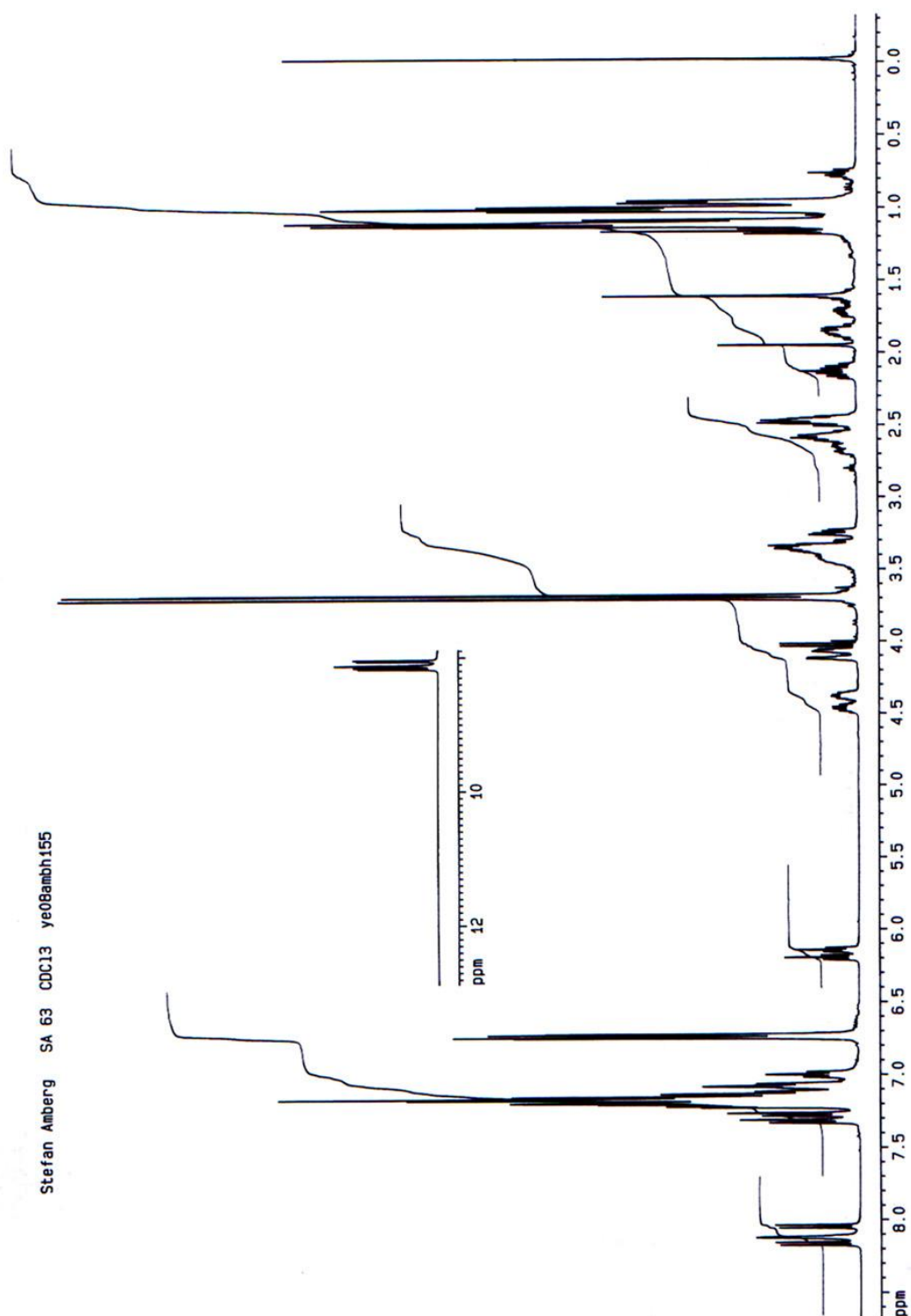


A3 ^1H -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan 75

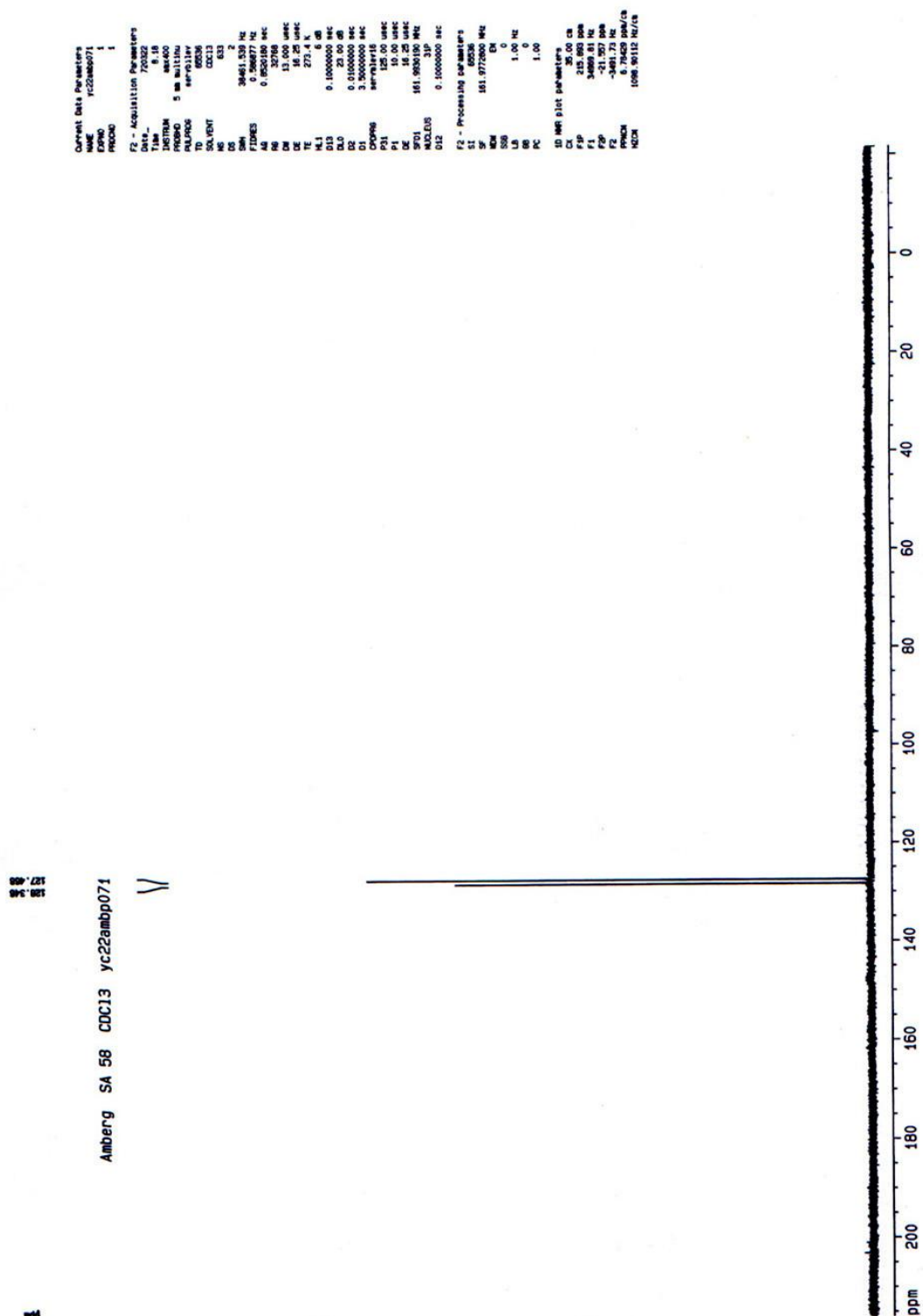
Sa256 CDCl₃ Amberg

A4 ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2-Phenylethyl(diisopropylamin)chlorphosphan **75**


A5 ^1H -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl]- N^4 -isobutyrylcytidin **104**

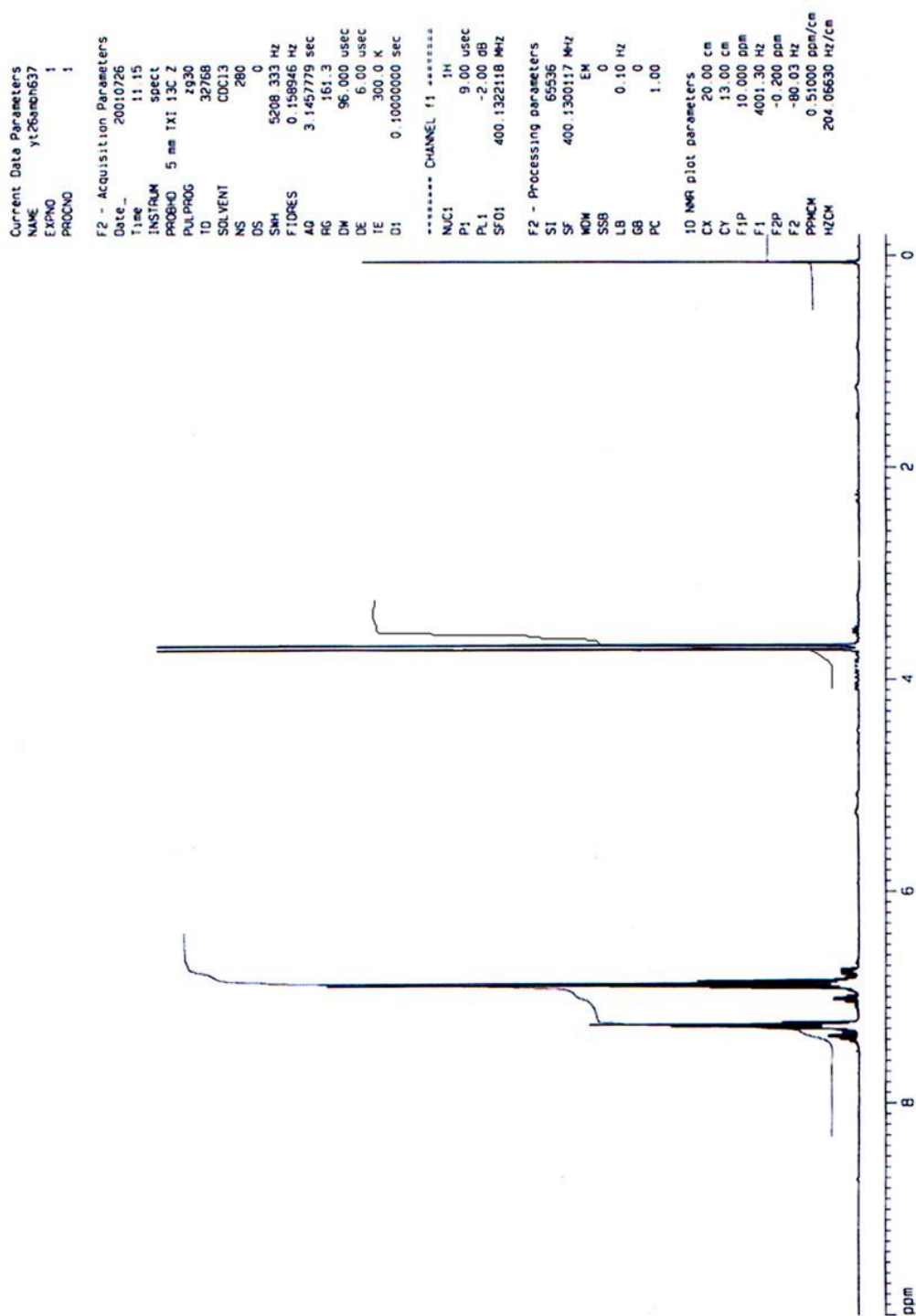


A6 ^{31}P -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2-Phenylethyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **104**



A7 ¹H-NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzylchlorphosphan 69

Amberg SA 183 CDC13



A8 ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzylchlorphosphan 69

Amberg SA 183 CDC13

178.522
178.480
178.453
178.381
178.375
178.330
178.304

```

Current Data Parameters
NAME      yt26amp637
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20010726
Time      10.13
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm 1X1 13C Z
PULPROG   zgpg30
TD         131072
SOLVENT   CDC13
NS         130
DS         4
SWH        46948.355 Hz
FIDRES     0.358188 Hz
AQ         1.3959668 sec
RG         18390.4
DM         10.650 usec
DE         6.00 usec
TE         300.0 K
D1         1.5000000 sec
d11        0.0300000 sec
d12        0.0002000 sec

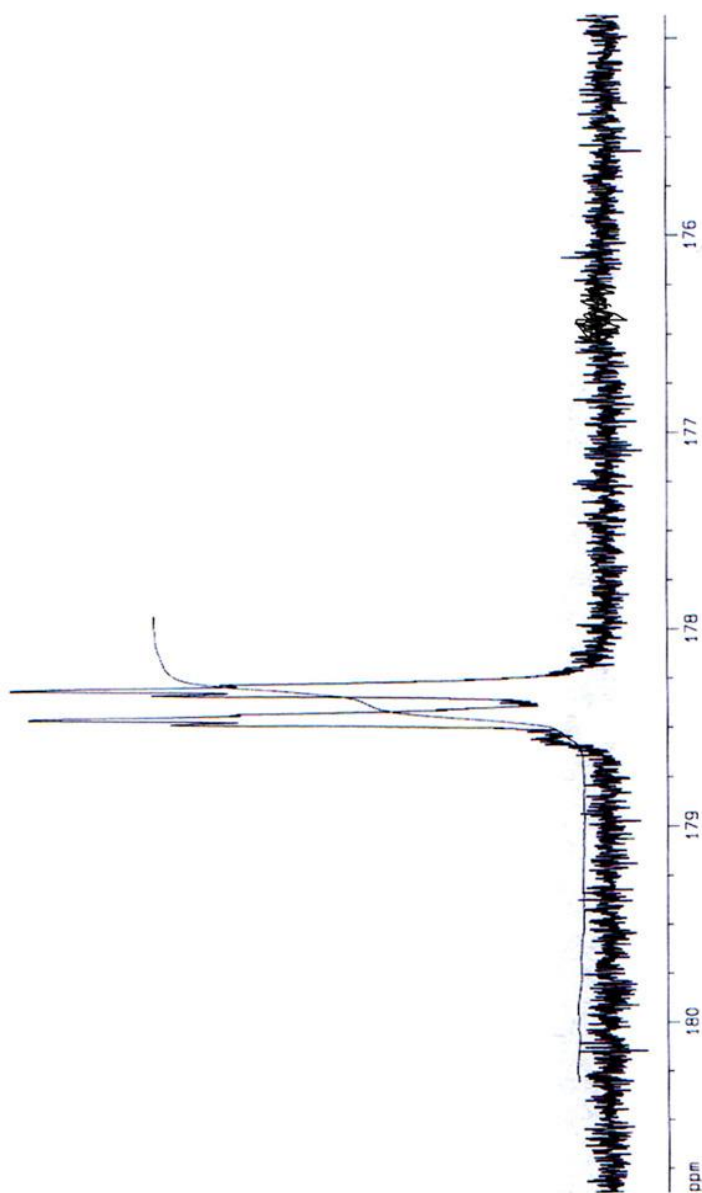
***** CHANNEL f1 *****
NUC1       31P
P1         28.00 usec
PL1        -3.00 dB
SFO1       161.9507807 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2    m81t215
NUC2       1H
PCPD2      74.00 usec
PL2        -2.00 dB
PL12       16.00 dB
PL13       20.00 dB
SFO2       400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         262144
SF         161.9753930 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.10 Hz
GB         0
PC         0.50

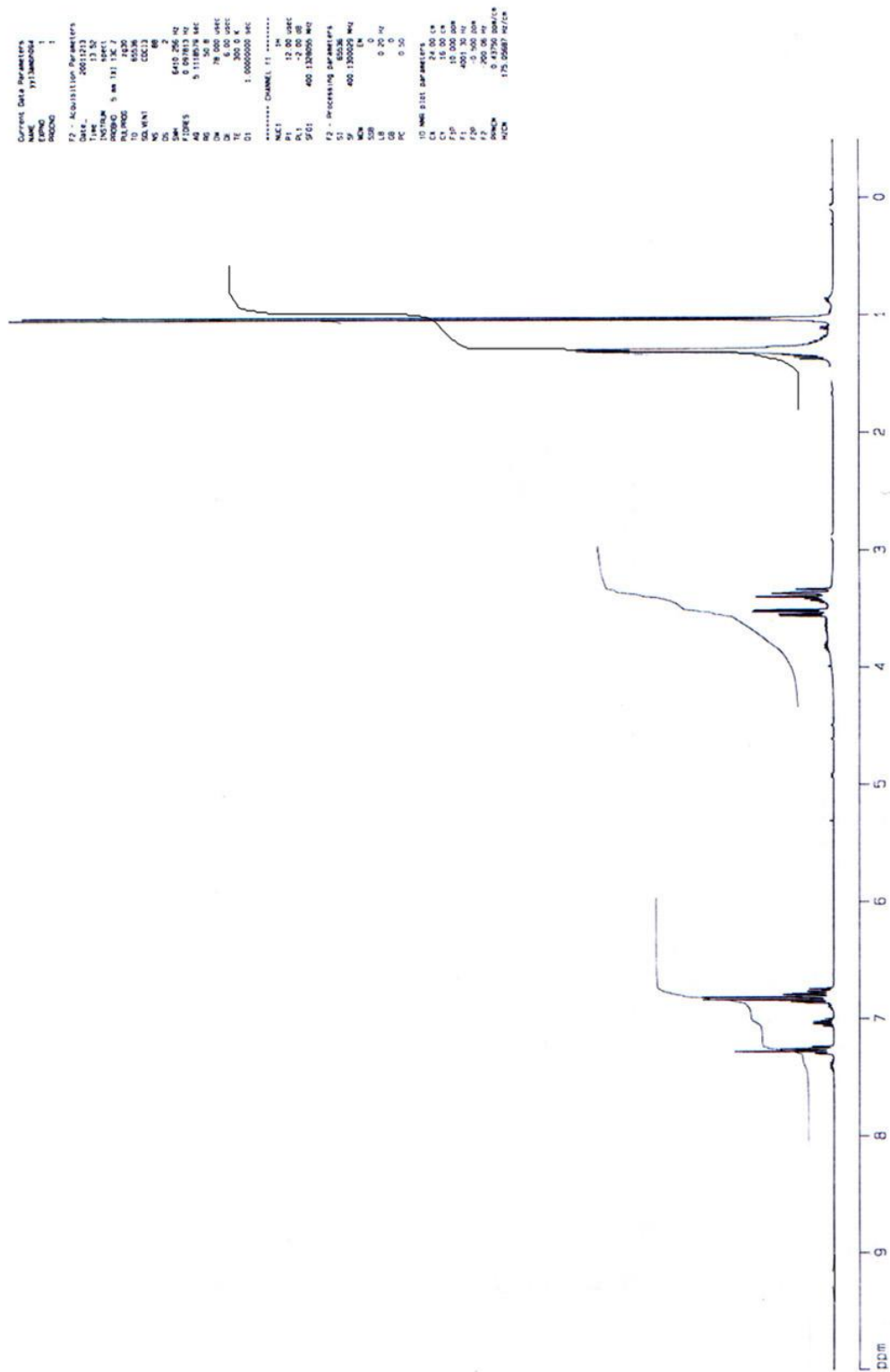
1D NMR plot parameters
CX         20.00 cm
CY         10.00 cm
F1P        180.873 ppm
F1         29296.94 Hz
F2P        174.882 ppm
F2         28326.54 Hz
PPHOM      0.29955 ppm/cm
HZCM       48.51971 Hz/cm

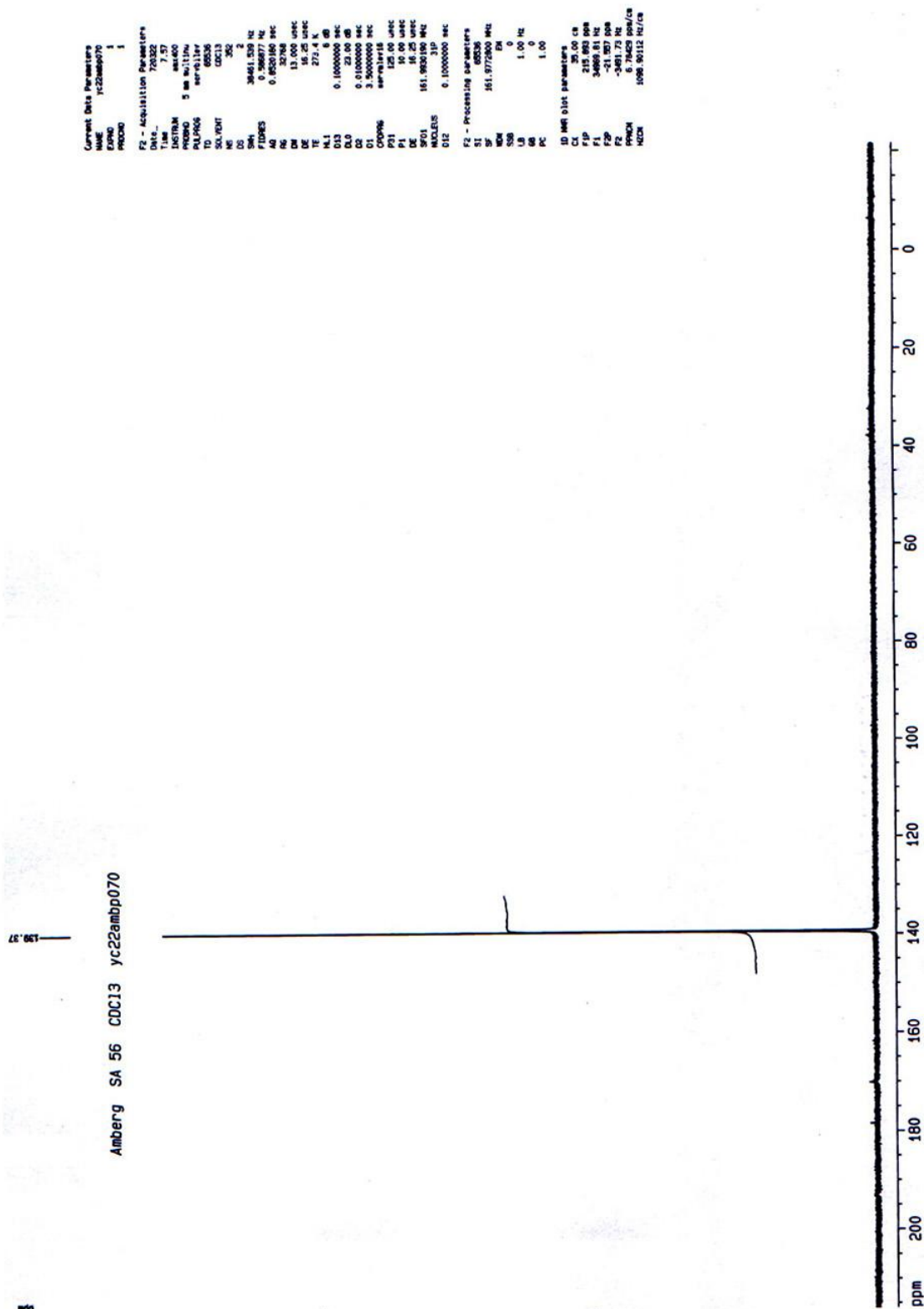
```



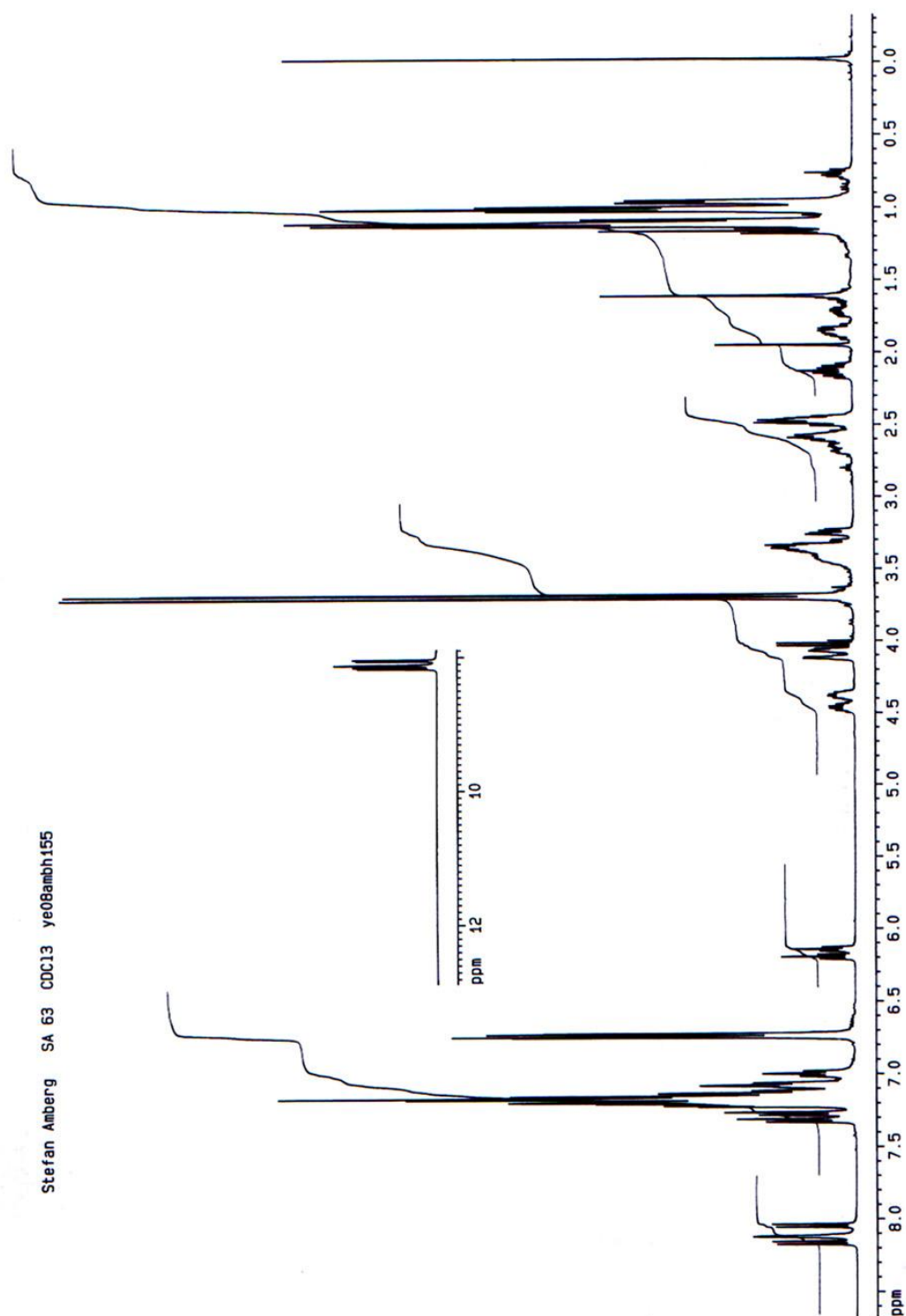
A9 ^1H -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83**

Amberg SA 184 CDC13 yy13ambh094

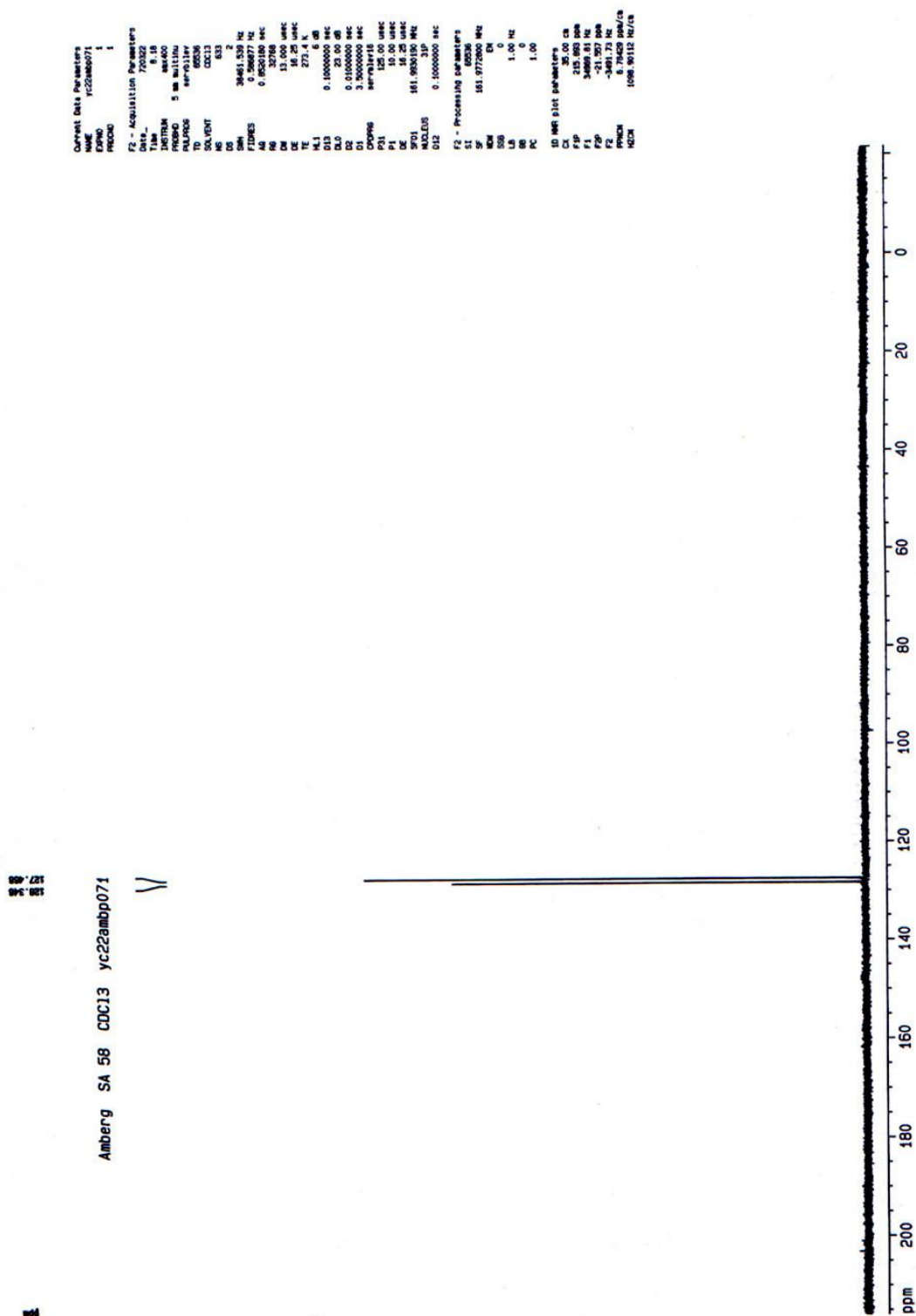


A10 ^{31}P -NMR-Spektrum vom 2,4-Difluorbenzyl(diisopropylamin)chlorphosphan **83**


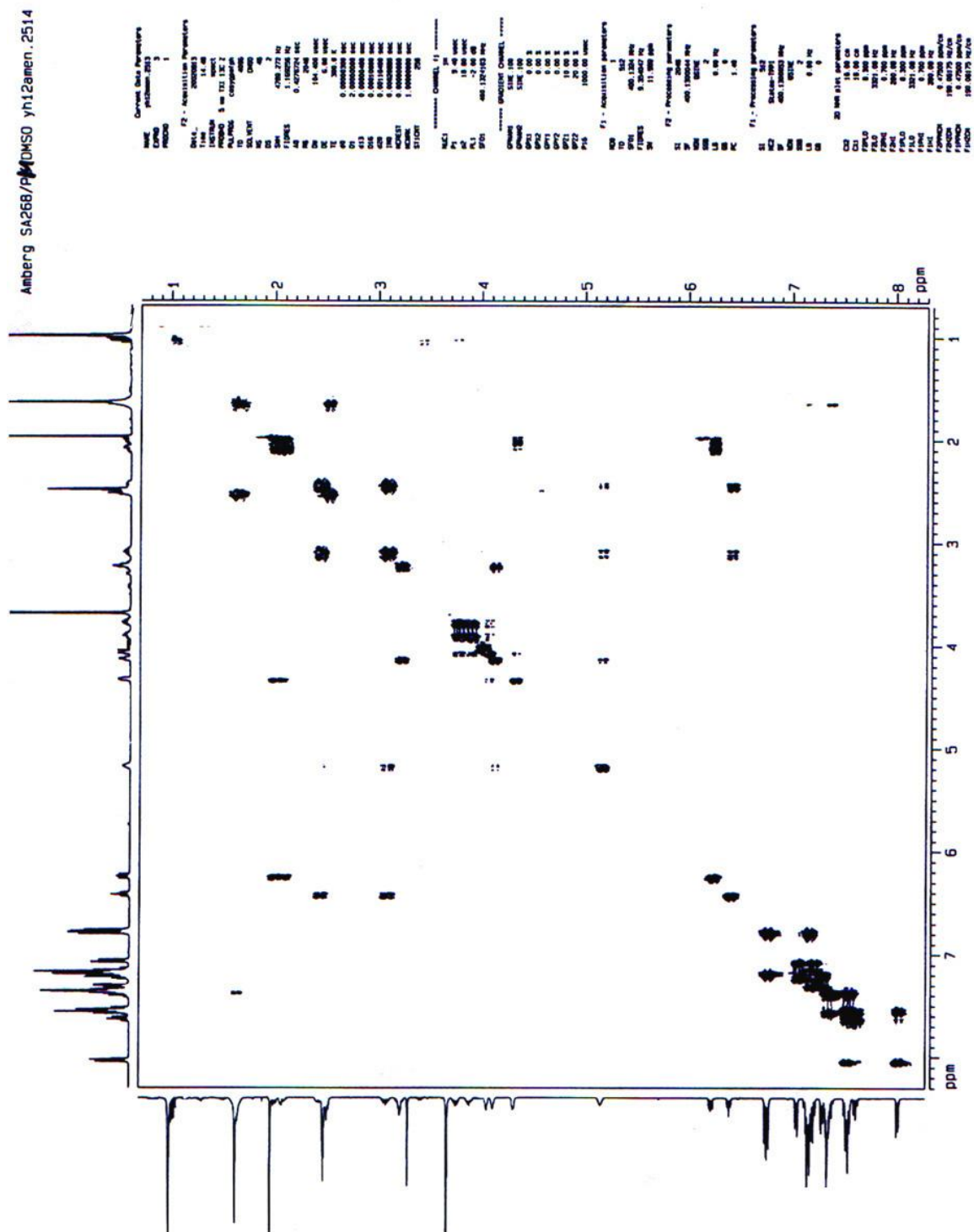
A11 ^1H -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl)- N^4 -isobutyrylcytidin **116**



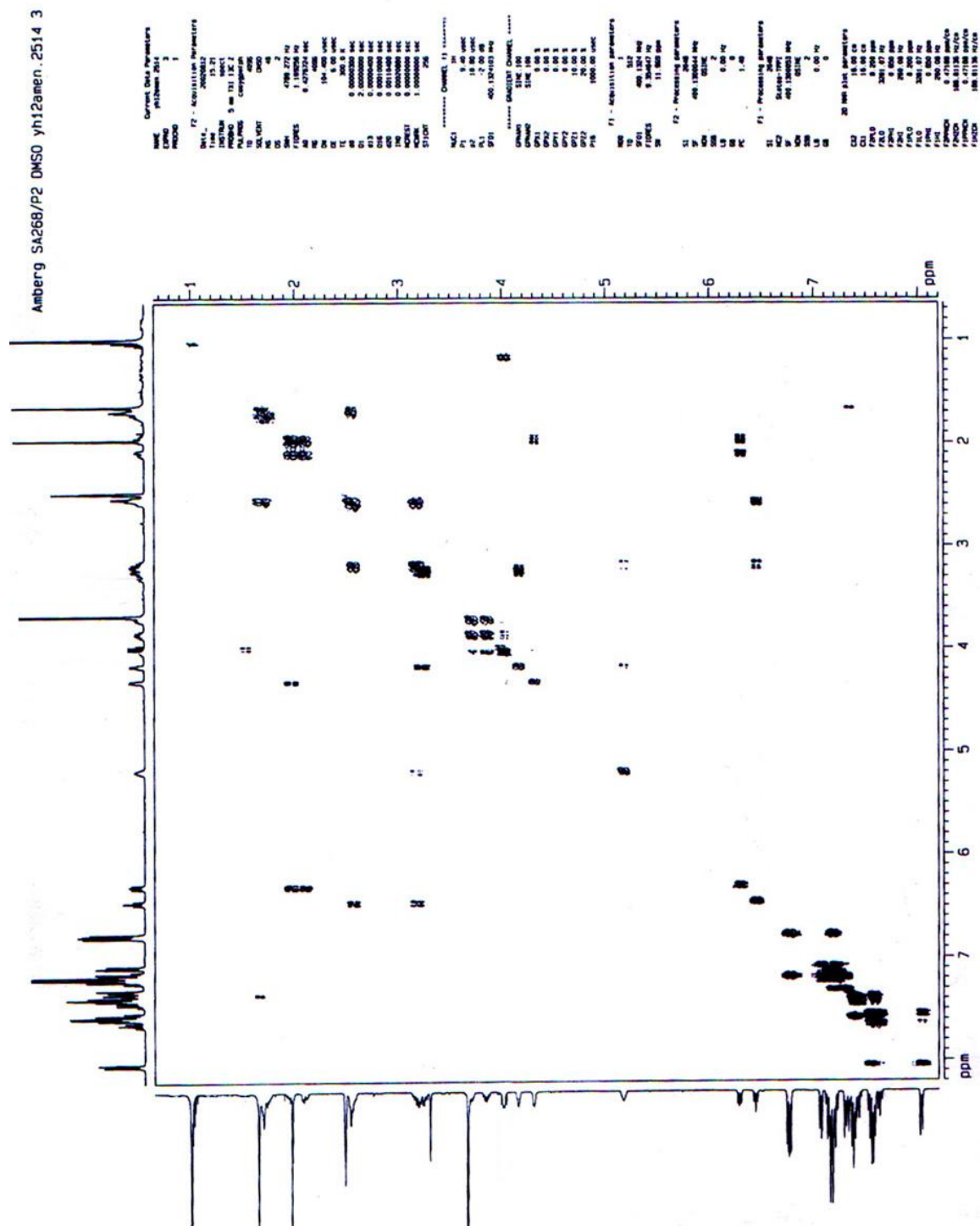
A12 ^{31}P -NMR-Spektrum vom 3'-O-[(2,4-Difluorbenzyl)(diisopropylamin)phosphan]-2'-desoxy-5'-O-[4,4'-dimethoxytrityl)-*N*⁴-isobutylcytidin **116**



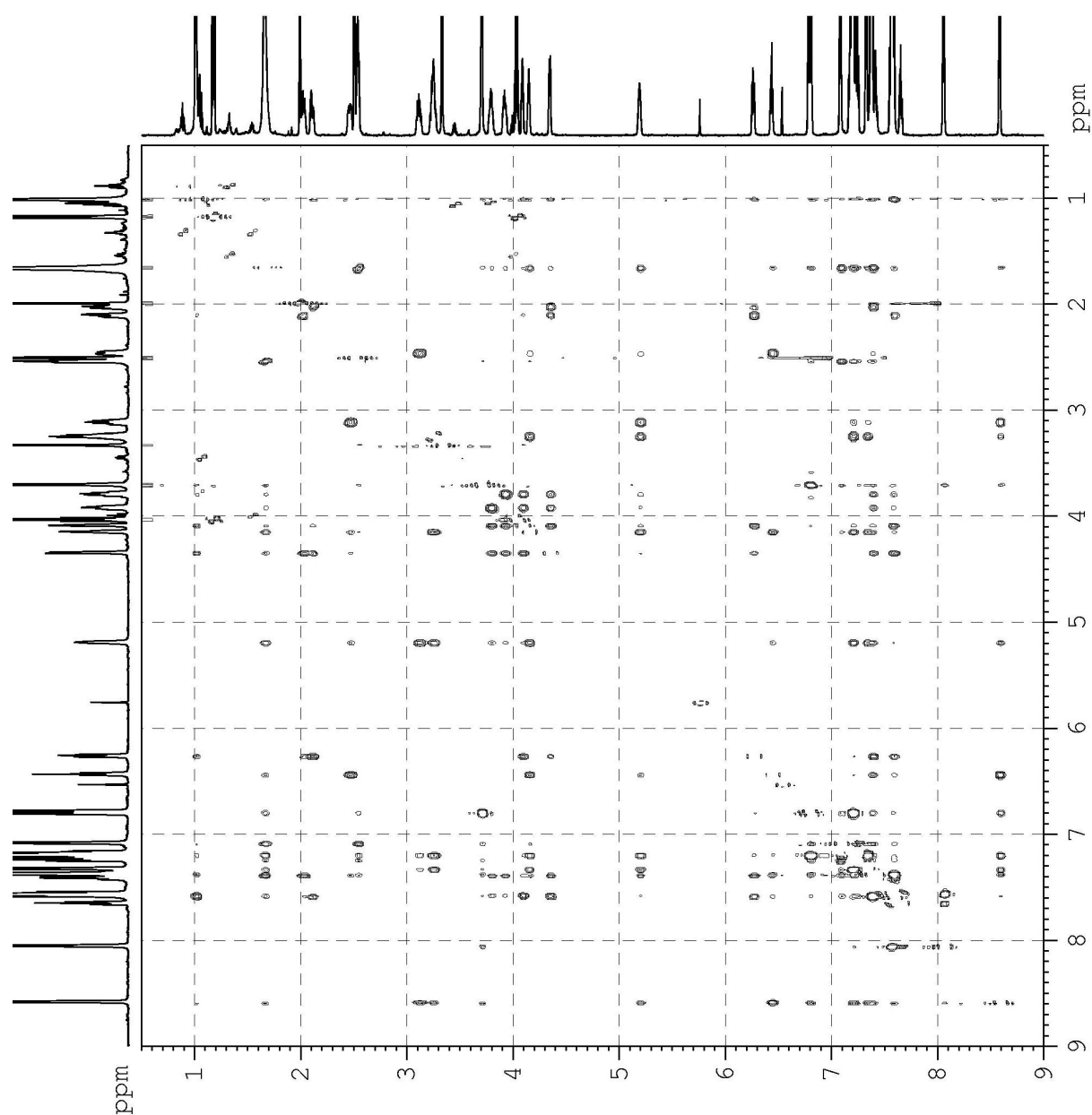
A14 $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum des Rp-konfigurierten [N^6 -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Rp**



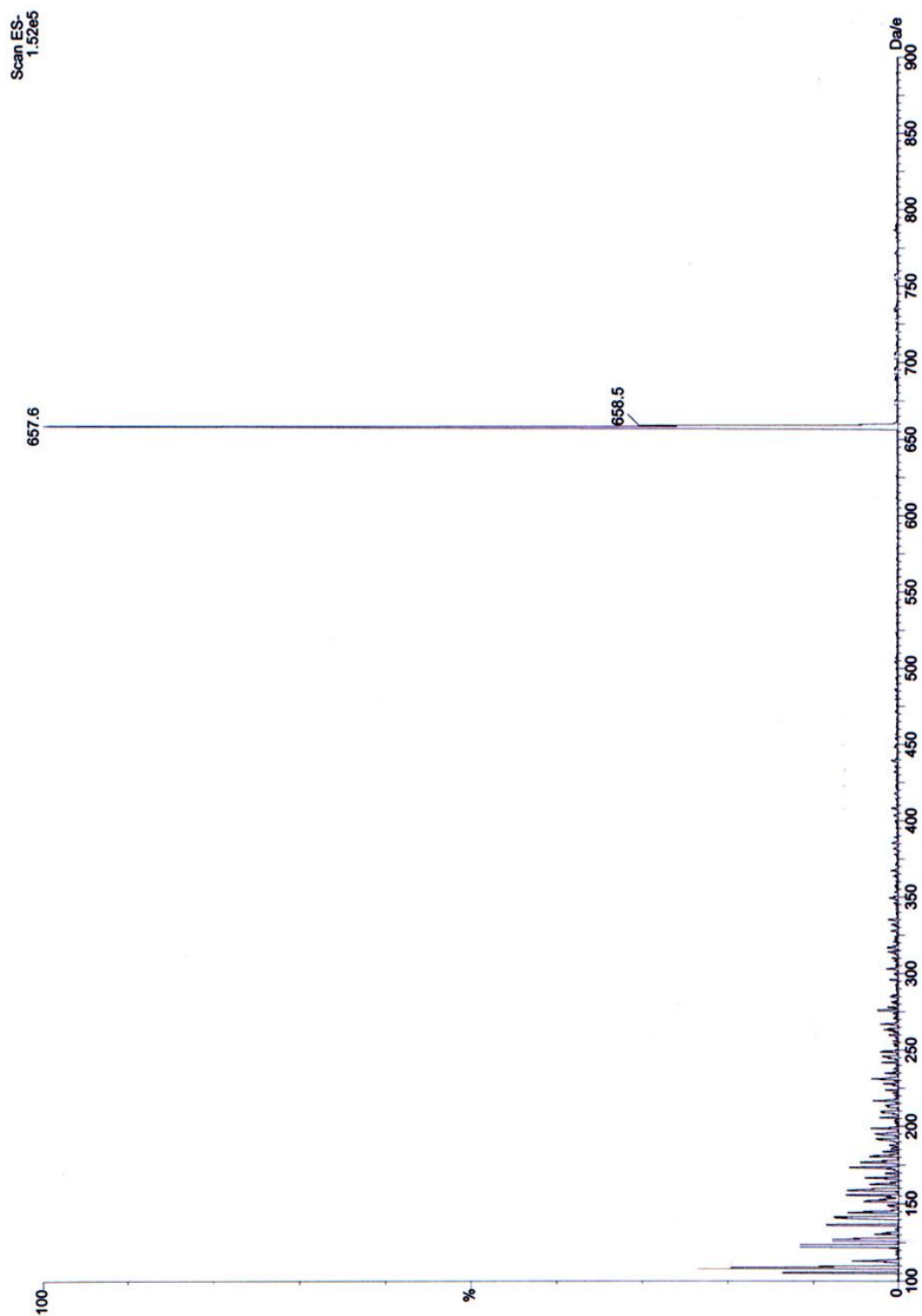
A16 ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten [*N*⁶-Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Sp**



A17 2D-ROESY-NMR-Spektrum des Sp-konfigurierten [*N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxyadenosin-3-yl]-[3'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-thymidin-5-yl] 3-phenylpropylphosphonat **135Sp**



A19 ESI(-)-Massenspektrum des Rp-konfigurierten (2'-Desoxycytidin-3-yl)-(2'-desoxyguanosin-5-yl) 3-phenylpropylphosphonat **142Rp**



Teil B Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACN	Acetonitril
AIBN	α,α' -Azoisobutyronitril
AIDS	erworbene Immunschwächekrankheit (engl.: <u>a</u> cquired <u>i</u> mmune <u>d</u> eficiency <u>s</u> yn <u>d</u> rome)
arom.	aromatische Protonen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
B	Base (im Sinne von Nucleobase)
B	Benzylmodifikation
b	breit
bp	Basenpaare
BSA	Benzolsulfonsäure
Bz	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C	Core
C	Cytosin, Cytidin
c	Konzentration
ca.	circa
CD	Circular-Dichroismus
CDTA	1,2-Diaminocyclohexantetraessigsäure
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CIP	Cahn Ingold Prelog
cm	Zentimeter

CMV	Cytomegalievirus
COSY	korrelierte Spektroskopie (engl.: correlated spectroscopy)
CPG	controlled pore glass
δ	chemische Verschiebung
d	Dichte in g/ml
d	Dublett
d	Schichtdicke
d	Desoxyribo
D	2-Phenylethylmodifikation
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
ΔE_{\max}	Differenz der Extinktion-Intensität im Extinktionsmaximum
ΔT_m	Differenz der DNA-Schmelzpunkte
dd	Dublett von Dublett
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFB	2,4-Difluorbenzyl
d.h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin (Hünigs Base)
DMSO	Dimethylsulfoxid
(d ₆)-DMSO	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	Dimethoxytrityl, Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>syn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DOTMA	<i>N</i> -[(1,2,3-Dioleoyloxy)propyl]- <i>N,N,N</i> -triethylammoniumchlorid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion (engl.: absorbance)
E	envelope
E	3-Phenylpropylmodifikation
ε	molarer Extinktionskoeffizient
E. coli	Escherichia coli
EDA-mix	Ethylendiamin-Abspaltungsreagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

engl.	englisch
ESI(-)	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
Et	Ethyl
et al.	et alii (und andere)
F	4-Phenylbutylmodifikation
Fa.	Firma
FC	Flash-Chromatographie
fl.	flüssig
G	Guanin, Guanosin
g	Gramm
ges.	gesättigt(e)
H	5-Phenylpentylmodifikation
h	Stunde(n)
HAV	Hepatitis A Virus
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
HUGO	Human Genome Organization
Hz	Hertz
I	(Naphth-1-yl)methylmodifikation
iBu	isobutyryl
ICAM-1	engl.: <u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule-1
iPr	Isopropyl
IRES	interne, ribosomale Angriffsstelle (engl.: <u>i</u> nternal <u>r</u> ibosomal <u>e</u> nt <u>r</u> y <u>s</u> ite)
J	Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie
J	3-(Naphth-1-yl)propylmodifikation

K	Kelvin
K	3-(Anthracen-9-yl)propylmodifikation
Kap.	Kapitel
kd	kilo-Dalton
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
λ_{\max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
λ_{Ex}	Einstrahlwellenlänge (engl.: Excitation)
L	2-Naphthoxymodifikation
LDI	Laserdesorption/Ionisation
LNA	Locked-Nucleinsäure (engl.: <u>l</u> ocked <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
log P	Verteilungskoeffizient
Lsg.	Lösung
M	molar
M	2,4-Difluorbenzylmodifikation
m	Masse
m	Multiplett
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: <u>m</u> atrix <u>a</u> ssisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption/ <u>i</u> onization)
max.	maximal
Me	Methyl
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
μM	mikromolar
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <u>m</u> essenger RNA)
MS	Massenspektrometrie

N	4-Fluorbenzylmodifikation
n	Alkylkettenlänge
n.b.	nicht berechnet
n.b.	nicht bestimmbar
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCR	nicht codierende Region (engl.: <u>n</u> on <u>c</u> oding <u>r</u> egion)
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMI	<i>N</i> -Methylamidimidazol
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: <u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
Nr.	Nummer
nt	Nucleotide
O	p-Methylbenzylmodifikation
o	ortho
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm, Extinktion bei 260 nm
ODN	Oligodesoxynucleotid
ORF	offener Leserahmen (engl.: <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> rame)
P	p-Methoxybenzylmodifikation
p	para
p.a.	pro analysi
pa	pseudoaxial
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (engl.: <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
pDC	präparative Dünnschichtchromatographie
pe	pseudoequatorial
PG	Schutzgruppe (allgemein)
pm	picometer
PNA	Peptid-Nucleinsäure
ppm	parts per million
ps	Phosphorthioat

θ	Elliptizität
Q	p- <i>t</i> -Butylbenzylmodifikation
q	Quartett
R	4-(4-Fluorphenyl)butylmodifikation
r	ribo
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase H	Ribonuclease H
ROE	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RP	Umkehrphase (engl.: <u>r</u> eversed <u>p</u> hase)
R _p	R-Konfiguration an einem Phosphoratom (CIP-Nomenklatur)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <u>r</u> otations per <u>m</u> inute)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Methylmodifikation
s	Singulett
s	Sekunde(n)
Sdp.	Siedepunkt
siRNP	RNA-Protein Komplex
Smp.	Schmelzpunkt
Sp	S-Konfiguration an einem Phosphoratom (CIP-Nomenklatur)
sym.	symmetrisch
T	Thymin, Thymidin
T	Temperatur
T	twist
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TaqPol	Thermus aquaticus Polymerase
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylsilyl

TBDPS	<i>tert.</i> -Butyldiphenylsilyl
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
techn.	technisch
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur (engl.: <u>m</u> elting <u>t</u> emperature)
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Flugzeit (engl.: <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonucleinsäure
U	Uracil, Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volumen
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbar (engl.: visible)
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
3Pp	3-Phenylpropyl

Teil C Publikationen, Vorträge und Poster

a) Publikationen

- **S. Amberg**, J. W. Engels. Synthesis and Properties of Non Polar DNA-(Arylalkyl)phosphonates. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 2503-2517.
- **S. Amberg**, J. W. Engels. Synthesis, Properties and Determination of the Configuration of Arylpropyl Backbone Modified Oligodeoxynucleotides. *Collection Symposium Series* **2002**, 5, 225-229.
- **S. Amberg**, J. W. Engels. Phenylalkyl backbone Modified Oligodeoxynucleotides, their synthesis and the influence of the alkyl chain length. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20(4-7), 1275-1278.
- **S. Amberg**, A. Tamke, W.H. Caselmann, J. W. Engels. Specific inhibition of hepatitis C viral gene expression by non polar (phenylalkyl)phosphonates. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22(5-8), in press.
- F. Seela, **S. Amberg**, A. Melenewski, and H. Rosemeyer. 5-Aza-7-deazaguanine DNA: Recognition and Strand Orientation of Oligonucleotides Incorporating Anomeric Imidazol[1,2- α]-1,3,5-triazine Nucleosides. *Helv. Chim. Acta* **2001**, 84, 1996-2014.

b) Vorträge

- **Synthesis and Properties of Nonpolar DNA (Arylalkyl)phosphonates. XII Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components, 03-08.09.2002 in Spinderuv Mlýn, Tschechische Republik.**

- **Specific Inhibition of Hepatitis C Viral Gene Expression by Differently Backbone Modified Antisense Oligonucleotides.** European Science Foundation (ESF) workshop, "Impact of Nucleic Acid Chemistry on Gene Function Analysis", 4-6.04.2002 in St. Goar, Deutschland.
- **Synthese und Eigenschaften Phenylalkyl-Rückgrat modifizierter Antisense-Oligonucleotide,** Vortragsveranstaltung der Chemischen Institute Frankfurt, 07.05.2002 in Frankfurt, Deutschland.

c) Poster

- **S. Amberg,** A. Tamke, J.W. Caselmann, J. W. Engels. Specific Inhibition of Hepatitis C Viral Gene Expression by Non Polar (Phenylalkyl)phosphonates. XVth International Roundtable "Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications", 10-14.09.2002 in Leuven, Belgien.
- **S. Amberg,** J. W. Engels. Specific Inhibition of Hepatitis C Viral Gene Expression by Differently Backbone Modified Antisense Oligonucleotides. European Science Foundation (ESF) workshop, "Impact of Nucleic Acid Chemistry on Gene Function Analysis", 4-6.04.2002 in St. Goar, Deutschland.
- **S. Amberg,** J. W. Engels. Phenylalkyl backbone modified oligodeoxynucleotides, their synthesis and the influence of the alkyl chain length. XIVth International Roundtable "Nucleosides, Nucleotides and their Biological Applications", 10-14.09.2000 in San Francisco, USA.
- A. Tamke, P. Hoffmann, M.A. González-Carmona, T. Heinicke, T. Sauerbruch, **S. Amberg,** J.W. Engels, W.H. Caselmann. Ein 17mer Antisense Oligodeoxynukleotid hemmt die HCV-Translation im Zellkultursystem spezifisch. 19. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, 24-25.01.2003 in Berlin, Deutschland.

Curriculum vitae

Stefan Amberg

* 02. Februar 1972 in Marktoberdorf

Schule

1978 - 1982	Grundschule Marktoberdorf
1982 - 1984	Hauptschule Marktoberdorf
1984 - 1989	Realschule Marktoberdorf
1989 - 1991	Fachhochschule an der NTA Isny/Allgäu

Ausbildung

1989 - 1991	Chemisch- technischer Assistent, Naturwissenschaftlich- Technische Akademie Prof. Dr. Grübler in Isny/Allgäu
-------------	---

Zivildienst / Beruf

1995 - 1996	Zivildienst am GSF-Forschungszentrum, Institut für Ökologische Chemie, München
1996 – 1996	Dipl. Chemie Ing. (FH) am GSF-Forschungszentrum (Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit), Institut für Ökologische Chemie, München

Studium

1991 - 1995	Diplom-Chemieingenieur (FH) Allgemeine Chemie an der Naturwissenschaftlich-Technischen Akademie Prof. Dr. Grübler in Isny/Allgäu
1994 - 1995	Diplomarbeit bei der Siemens AG, Bereich KWU in Erlangen <u>Thema:</u> Entwicklung und Optimierung eines Dekontaminationsverfahrens mit Ozon als Oxidationsmittel
1997 – 1999	Diplom- Chemiker an der Universität Osnabrück
1998 – 1999	Diplomarbeit, AK Prof. Seela, Institut für Organische Chemie, Universität Osnabrück. <u>Thema:</u> Purin-Purin Basenpaarungen in Oligonucleotid-Duplexen unter Beteiligung der α -D- und β -D-anomeren 2'- Desoxynucleoside des 5-Aza-7-desazaguanins
9.1999 – 6.2003	Doktorarbeit im Rahmen eines Kèkulé- Stipendiums, AK Prof. Engels, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main.